

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**VALENTÍN CÓPPOLA SEGOVIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVO MODELO EM DOENÇA  
DE PARKINSON BASEADO NO ESTRESSE DE  
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO CELULAR**

**CURITIBA**

**2014**

**VALENTÍN CÓPPOLA SEGOVIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVO MODELO EM DOENÇA  
DE PARKINSON BASEADO NO ESTRESSE DE  
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO CELULAR**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e  
Molecular, da Universidade Federal do  
Paraná, como requisito à obtenção de  
título de Mestre**

**Orientador: Dr. Silvio Marques Zanata**

**Co-Orientador: Dra. Clarissa Cavarsan**

**CURITIBA**

**2014**



# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

---

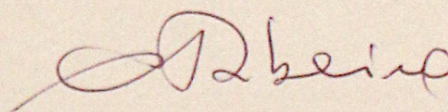
## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Valentín Cópola Segovia**, no dia 29 de Outubro de 2014, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, intitulada: "Caracterização de novo modelo em Doença de Parkinson baseado no estresse celular", com a banca examinadora composta pelos professores: Drs. Anete Curte Ferraz (da Universidade Federal do Paraná), Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (da Universidade Federal do Paraná), Clarissa Fantin Cavarsan (co-orientadora, da Universidade Federal do Paraná) e Silvio Marques Zanata (da Universidade Federal do Paraná, como orientador e presidente da Banca Examinadora), e foi Aprovado.

A solicitação de emissão do Diploma de Mestre em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta declaração tem validade de 60 (sessenta) dias.

Curitiba, 29 de Outubro de 2014



Prof. Dr. Ciro A. Oliveira Ribeiro  
- Depto. Biologia Celular / UFPR  
Mat. Siapc 0342961



Cóppola Segovia, Valentín

Caracterização de novo modelo em Doença de Parkinson baseado no estresse de retículo endoplasmático celular / Valentín Cóppola – Curitiba, 2014

63 folhas

Orientador: Silvio Marques Zanata

Co-Orientador: Clarissa Fantin Cavarsan

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná

1.Estresse de retículo endoplasmático 2.Doença de Parkinson 3. Tunicamicina  
4.6-OHDA 5.Neurodegeneração



# SUMARIO

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 DOENÇA DE PARKINSON .....	10
1.2 FISIOPATOLOGIA DA DP .....	12
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DP .....	16
1.4 RETICULO ENDOPLASMÁTICO .....	20
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
5.1 MODELO EXPERIMENTAL .....	26
5.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA .....	26
5.3 COMPORTAMENTO .....	27
5.4 PERFUSÃO E OBTENÇÃO DO ENCÉFALO PARA ANÁLISE .....	28
5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	29
5.6 WESTERN BLOT .....	30
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	33
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
6.1 INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RE NA SNpc .....	34
6.2 AVALIAÇÃO DE DANO CELULAR NA SNpc .....	35
6.3 EXPRESSÃO DE TH – SOBREVIDA DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS .....	39
6.4 EFEITOS DA TUNICAMICINA E 6-OHDA SOBRE O COMPORTAMENTO .....	41
6.4.1 CAMPO ABERTO .....	41
6.4.2 FOOTPRINT .....	43
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>51</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>11. ANEXO .....</b>	<b>64</b>

# AGRADECIMENTOS

- *Governo do Brasil - CAPES - CNPq*
- *UFPR*
- *PPG em Biología Celular e Molecular*
- *Banca (Prof. Maria Vital, Prof. Anete Curte Ferraz)*
- *Silvio, Lia, Adriana (chefes do laboratório)*
- *Colegas do laboratório*
- *Clarissa e Flavia (colegas trabalho dessa tese)*
- *Minha namorada Fernanda, sem dúvidas esse logro não teria*

*sido possível de realizar sem o apoio dela. E minha Família, que*

*estando longe e fazendo falta, igualmente dão força o tempo*

*todo pra continuar nesse caminho. Esse logro também é mérito*

*deles*

# RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma patologia neurodegenerativa, caracterizada pela morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos da Substância Nigra *pars compacta* (SNpc), encontrando-se manifestações clínicas como tremor de repouso, rigidez e bradicinesia. Além da morte de neurônios dopaminérgicos, as alterações mais características da DP são presença de inclusões citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy (formados principalmente por filamentos de proteínas como  $\alpha$ -sinucleína), recrutamento e ativação de micróglia e astróglia na SNpc e o subsequente desenvolvimento de um processo inflamatório. Por outro lado, o estresse de retículo endoplasmático (RE) apresenta um importante papel na progressão das doenças neurodegenerativas. No entanto, ainda não foi esclarecido se o estresse é uma causa ou uma consequência na gênese das enfermidades neurodegenerativas. No presente trabalho foi avaliado o papel do estresse de RE como único estímulo inicial na geração de um fenótipo Parkinsoniano, comparado com um modelo já estabelecido (6-OHDA) para o estudo da DP. Em nosso modelo animal para o estudo de Parkinson, a lesão gerada na SNpc é exclusivamente pelo efeito do estresse de RE. Após 7 dias de gerada a lesão, os animais injetados com Tunicamicina e 6-OHDA apresentaram aumento de marcadores prototípicos para avaliar estresse de RE, aumento na quantidade de células gliais ativadas, e morte celular inespecífica no sítio da lesão. Essas mudanças foram acompanhadas por um aumento na expressão de marcadores associados à ativação microglial e começo de um processo inflamatório. Por outro lado, não foram observadas diferenças nos níveis de sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, assim como nos níveis da síntese de TH. No entanto, conseguiu-se observar diferenças no comportamento locomotor nos animais injetados com Tunicamicina e 6-OHDA. Todos esses dados sugerem que o estresse de RE poderia apresentar um papel muito importante no desencadeamento da DP.



# ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive death of dopaminergic neurons of Substance Nigra *pars compacta*, usually are found clinical manifestations such as resting tremor, rigidity and bradykinesia. Besides the death of dopaminergic neurons, the changes most characteristic of PD are the presence of cytoplasmic inclusions called Lewy bodies (mainly formed by filament proteins as  $\alpha$ -synuclein), of microglia and astroglia recruitment in the SNpc and the subsequent development of an inflammatory process . On the other hand, the endoplasmic reticulum stress (ER-stress) has an important role in the progression of neurodegenerative diseases. However, it remains unclear whether ER-stress is cause or consequence in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In this study we evaluated the role of ER stress as single stimulus in the generation of a Parkinsonian phenotype, compared to a model already established (6-OHDA) for the study of PD. In our animal model for the study of Parkinson's disease, the lesion is generated in the SNpc exclusively by the effect of ER-stress. Generated 7 days after injury, the animals injected with 6-OHDA and Tunicamycin exhibited increased prototypic marker to assess stress RE, increased in the amount of activated glial cells and nonspecific cell death at the site of injury. These changes were accompanied by an increase in microglial activation and early markers of an inflammatory process. Furthermore, no differences in the levels of survival of dopaminergic neurons in the levels of TH synthesis was observed. However, were able to observe differences in locomotor behavior in animals injected with 6-OHDA and Tunicamycin. All these data suggest that ER stress could present a very important role in the onset of PD.

# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS COMPONENTES MOTORES DOS NÚCLEOS DA BASE.....	10
FIGURA 2 – ESQUEMA DOS COMPONENTES DA RESPOSTA AO ESTRESSE DE RE EM MAMÍFEROS.....	20
FIGURA 3 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE GRP94 E GRP78 NA SN.....	33
FIGURA 4 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE PDI NA SN.....	34
FIGURA 5 – ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DA SNPC PARA MARCAÇÕES DE GFAP E OX42.....	35
FIGURA 6 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE NF- $\kappa$ B NA SN.....	36
FIGURA 7 – ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DA SNPC PARA MARCAÇÕES DE CASPASE-3 ATIVADA .....	37
FIGURA 8 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE CASPASE-3 ATIVADA NA SN .....	38
FIGURA 9 – ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DA SNPC PARA MARCAÇÕES DE TH.....	39
FIGURA 10 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE TH NA SN.....	40
FIGURA 11 – ANÁLISE DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO CAMPO ABERTO.....	41
FIGURA 12 – ANÁLISE DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO FOOTPRINT.....	42

# 1. INTRODUÇÃO

## 1. DOENÇA DE PARKINSON

Depois da doença de Alzheimer, a Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, estimando-se que existam aproximadamente 6 milhões de pessoas afetadas no mundo, segundo dados de EPDA, NPF e PDF (European Parkinson's Disease Association – National Parkinson Foundation – Parkinson Disease Foundation). A DP foi inicialmente descrita em 1817 pelo Dr. James Parkinson, como uma paralisia agitante. Os sintomas mais característicos são a escassez de movimentos espontâneos, bradicinesia, rigidez, tremor no repouso, anormalidades na marcha e transtornos posturais (MAYEUX 2003). Paralelamente aos sintomas motores, os portadores desta doença podem apresentar manifestações não motoras, tais como, comprometimento da memória (COUSINS et al., 2000; HOWELLS et al., 2005; JELLINGER, 2007), distúrbios cognitivos e do sistema nervoso autônomo (DIAZ et al., 2001; JELLINGER, 2007), alterações do sono (GARCIA-BORREGUERO et al., 2003) e depressão (DA SILVA et al., 2008).

A principal característica anatomopatológica da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos da Substância Nigra *pars compacta* (SNpc). Esses neurônios dopaminérgicos projetam seus axônios rostralmente, via o feixe medial do prosencéfalo até o corpo estriado, onde existe uma diminuição concomitante de dopamina (DA) (SHERER et al., 2007; MCNAUGHT & JENNER, 2001). Além da morte de neurônios dopaminérgicos, a DP também é caracterizada pela formação de corpos de inclusões intracitoplasmáticas, chamadas Lewy Bodies (LBs), e reativação glial (SPILLANTINI et al., 1998; BRAAK & BRAAK, 2000; EMBORG, 2004). Os sintomas motores da DP começam quando a degeneração da SNpc é avançada, alcançando 50-80% de morte dos neurônios dopaminérgicos (BEZARD et al., 2001; TADAIESKY et al., 2008), motivo pelo qual é difícil desenvolver terapias curativas para essa doença.



A SNpc é uma estrutura mesencefálica que tem um papel importante na geração dos movimentos voluntários. Em condições normais a inervação dopaminérgica diminui as eferências inibitórias dos GB, aumentando a saída excitatória do tálamo para o córtex motor, facilitando os atos motores específicos. No entanto, quando os neurônios dopaminérgicos da SNpc morrem na DP, as eferências inibitórias dos GB são anormalmente altas, inibindo a ativação do tálamo e do córtex motor, gerando os transtornos hipocinéticos da DP (Figura 1).

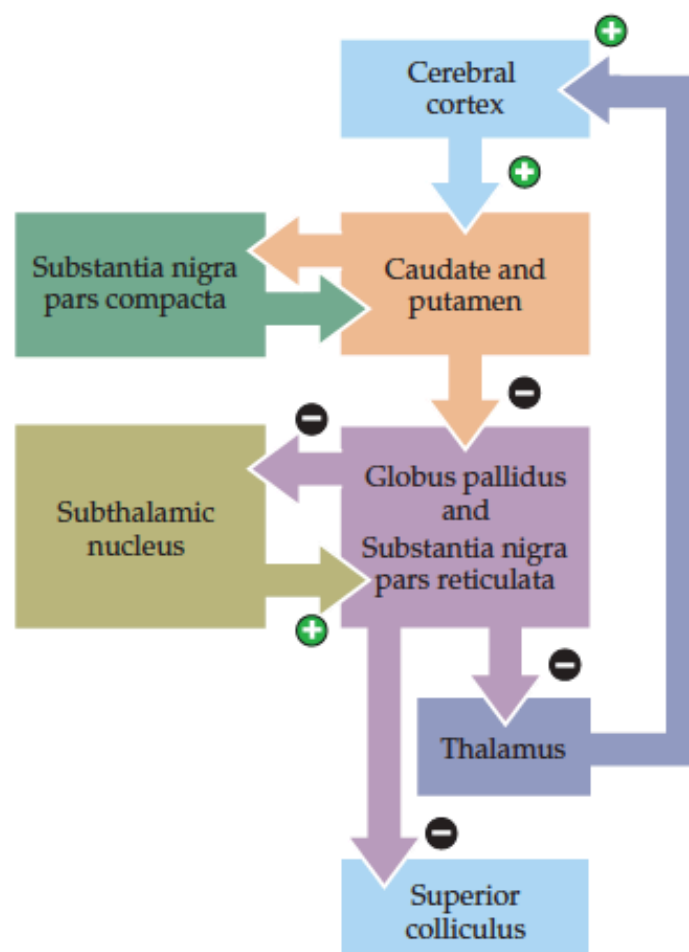


FIGURA 1. ESQUEMA BÁSICO DOS COMPONENTES MOTORES DOS NÚCLEOS DA BASE. OS SÍMBOLOS + INDICAM SINAPSES EXCITATÓRIAS, E - INDICAM SINAPSES INIBITÓRIAS.

FONTE: PURVES, AUGUSTINE, FITZPATRICK, HALL, LAMANTIA, MCNAMARA, WILLIAMS (2004).

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA DP

A etiologia da DP é desconhecida e afeta principalmente pessoas maiores de 65 anos de idade. Aproximadamente 90% dos casos são esporádicos, sem uma etiologia claramente associada, e o restante 10% são casos familiares associados a uma origem genética. As formas genéticas apresentam um início mais cedo da sintomatologia, e uma sobrevida menor (SIMUNI, 2007; REDGRAVE et al., 2010). Esses dados são semelhantes ao que ocorre em várias das doenças neurodegenerativas mais frequentes como Alzheimer ou Esclerose Lateral Amiotrófica, devido à existência de vários mecanismos patogênicos capazes de contribuir com o início e o desenvolvimento/agravamento do dano degenerativo no sistema nervoso central (Referências). O único fator de risco reconhecido na DP é o envelhecimento (SIMUNI, 2007), no entanto existe uma importante variedade de fatores que são reconhecidos por aumentar o risco de desenvolver DP, como pesticidas e toxinas (fatores ambientais), infecções do SNC, trauma craniano, assim como o estilo de vida entre outros (CHADE et al., 2006; SHERER et al., 2007; BOVÉ & PERIER, 2012). Desta forma, pode-se concluir que a DP é uma doença de origem multifatorial, onde o principal fator de risco é a idade, em que alguns dos fatores envolvidos na progressão desta doença são: 1) estresse oxidativo, 2) disfunção mitocondrial, 3) alteração das vias de degradação proteica, e 4) causas genéticas.

### 1.2.1 *Estresse Oxidativo*

Os radicais livres são todas as espécies químicas que contem um ou mais elétrons não pareados, capazes de oxidar outras moléculas pela capacidade de aceitar elétrons (MIGLIORE & COPPEDÈ, 2009). A geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs) é devido à perda de elétrons desde a cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria, o que resulta na redução da molécula de oxigênio em superóxido ( $O_2^-$ ) ou peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A geração das EROs é uma consequência inevitável na dependência do  $O_2$  na respiração celular. No entanto, em excesso, o  $O_2$  é potencialmente tóxico, e as

células desenvolveram diferentes sistemas antioxidantes utilizados para a eliminação de essas espécies reativas.

A DA, o neurotransmissor sintetizado pelos neurônios dopaminérgicos da SNpc, quando degradada pela enzima MAO (monoamino-oxidase), induz a produção de dopamina quinona reativa e outras espécies reativas (como  $H_2O_2$ ), que podem alterar diretamente várias moléculas (STOKES et al., 1999; DANIELSON & ANDERSEN, 2008; RAPPOLD & TIEU, 2011). Baseado nisso, é possível pensar que o potencial oxidativo da DA pode servir como explicação da susceptibilidade seletiva dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Jenner 2007; TSANG & CHUNG 2009). Além disso, o aumento do estresse oxidativo na DP quando somado à maior susceptibilidade que apresentam as pessoas da terceira idade parece ser um processo importante na geração da DP.

### ***1.2.2 Disfunção mitocondrial***

As mitocôndrias são importantes na execução de vários processos como: oxidação do piruvato, ciclo de Krebs, metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos, esteroides, e na geração de energia na forma de ATP. Além de fornecer energia à célula, cumpre um papel fundamental na homeostase do  $Ca^{2+}$ . Alterações no funcionamento de quaisquer dessas funções são potenciais geradores de doenças, e têm sido ligados a patogênese da DP. A disfunção mitocondrial poderia levar a uma deficiência na produção de ATP e geração de EROs, favorecendo o dano no DNA mitocondrial ( $DNA_{mt}$ ) e ativando as vias apoptóticas mitocondriais (SCHAPIRA et al., 1992; LEVY et al., 2009; FEDERICO et al., 2012). Por outro lado, acredita-se que a redução na atividade do complexo I mitocondrial na DP, seja, pelo menos em parte, resultado da acumulação de mutações no  $DNA_{mt}$  dos pacientes com DP (Bender et al., 2006). Esses dados encontrados em humanos são corroborados por um estudo em roedores no qual a deleção do fator de transcrição mitocondrial A no mesencéfalo gera progressivamente a DP, devido a redução da expressão de  $DNA_{mt}$  e a deficiência no funcionamento da cadeia respiratória (EKSTRAND et al., 2007).

Além disso, mutações de proteínas mitocondriais associadas com formas familiares de DP, como: PINK1 (PARK6), Parkin (PARK2),  $\alpha$ -sinucleína, LRRK2,



DJ-1, também são associadas com disfunção das vias de degradação proteica e dano oxidativo com a progressão do DP (THOMAS & BEAL, 2007). A  $\alpha$ -sinucleína, principal constituinte dos LBs, parece relacionar degradação proteica anormal, com estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, uma vez que a superexpressão de  $\alpha$ -sinucleína induz dano mitocondrial devido ao acúmulo dessa proteína (MARTIN et al., 2006); do contrário, a falta dela, torna os camundongos menos susceptíveis a toxinas mitocondriais (KLIVENYI et al., 2006; NIETO et al., 2006). Por outro lado, a proteína Parkina parece estar relacionada ao sistema de ubiquitina-proteassoma, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial; dado que animais *knockout* para Parkina apresentam aumento de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (PESAH et al., 2004). Esses dados sugerem que fatores que diretamente ou indiretamente modulem as funções mitocondriais, comprometem a sobrevivência neuronal e podem apresentar importante papel no desenvolvimento da DP. Com o aumento de estudos nesse sentido, tem se tornado cada vez mais claro que o dano oxidativo e disfunções mitocondriais apresentam papel central nessa patogênese, sendo responsável tanto pelo desenvolvimento da DP esporádica como familiar.

### **1.2.3 Alteração das vias de degradação proteica**

As células tem vários mecanismos para a degradação de proteínas mal dobradas: o sistema ubiquitina-proteossoma e a via autofágica-lisossomal.

Sistema Ubiquitina-Proteossoma: esse mecanismo é o principal responsável pela degradação não lisossomal de proteínas anormais, mutantes ou danificadas como causa do estresse oxidativo. Os proteossomas são complexos proteicos que degradam proteínas que foram marcadas com ubiquitina, um sistema presente para marcar proteínas que necessitam ser degradadas. As proteínas E1, E2 e E3 são o grupo de proteínas ubiquitina ligases responsáveis pela marcação com ubiquitina das proteínas a serem degradadas. Em amostras de autopsia de pacientes diagnosticados com DP, foi encontrada diminuição de até 40% na atividade proteossomal (MCNAUGHT

& JENNER, 2001; MIZUNO et al., 2001; LEVY et al., 2009). Shimura e colaboradores demonstraram que Parkina, uma proteína ligase E3, está intimamente relacionada com a degradação proteica via proteossoma (SHIMURA et al., 2000). Dessa forma diferentes tipos de mutações (deleções e mutações pontuais), na proteína Parkina resulta na perda de atividade E3, contribuindo na acumulação de proteínas mal dobradas e formação dos LBs, nos casos familiares de DP (MIZUNO et al., 2001).

Via autofágica-lisossomal: é um importante processo usado para reciclar agregados proteicos e organelas danificadas. Esse processo envolve uma dinâmica interação entre lisossomos e endossomos, assim como os autofagossomos. Com a idade, há alterações nessas interações que podem gerar doenças neurodegenerativas, como Doença de Alzheimer e DP (NIXON 2013). Na DP existe um acúmulo de autofagossomas associados a um déficit na atividade dessa via, contribuindo diretamente com redução da proteólise de  $\alpha$ -sinucleína e de outros substratos (LEVY et al., 2009;). Diferentes formas de  $\alpha$ -sinucleína são degradadas por diferentes mecanismos; a forma solúvel é degradada pelo sistema de ubiquitina-proteossoma ou por autofagia mediada por chaperona (WEBB et al., 2003; CUERVO et al., 2004), a forma insolúvel é quebrada por macroautofagia (RIDEOUT et al., 2004). Mutações no gene de  $\alpha$ -sinucleína geram agregação dessa proteína que podem ser a causa da formação dos LBs e da consequente neurodegeneração. Evidências experimentais *in vitro* sugerem que a formação dos LBs deva estar associada com uma resposta protetora, com o propósito de sequestrar as proteínas da  $\alpha$ -sinucleína danificadas (LEVY et al., 2009). Além disso, a DA pode-se conjugar à  $\alpha$ -sinucleína, formando um complexo resistente capaz de bloquear a degradação de outras proteínas, resultando na acumulação de proteínas tóxicas para as células, desencadeando processos de morte celular (LEVY et al., 2009; TSANG & CHUNG 2009).

De qualquer forma, nesse contexto da DP, dado alguns casos onde ocorre esse processo, a via autofágica-lisossomal é protetora, e ao mesmo tempo destrutiva, promovendo a morte de neurônios dopaminérgicos. Há assim, a

necessidade da busca do equilíbrio entre o potencial terapêutico e deletério da autofagia-lisossomal no contexto da DP.

#### **1.2.4 Causas genéticas**

Em 1996, o mapeamento e identificação de mutações responsáveis pela DP, demonstraram que a DP possa ser hereditária (POLYMEROPOULOS et al., 1996, 1997). Entretanto, dois anos depois, outras alterações cromossômicas foram relacionadas a essa doença, assim como a exclusão dos genes inicialmente identificados para certos casos de doenças familiares (MUÑOZ et al., 1997; SCOTT et al., 1997; 1999; FARRER et al., 1998). Dessa forma, a DP passou a ser caracterizada como uma doença geneticamente heterogênea.

Uma das característica patognomônica na DP é a presença dos LBs (agregados de filamentos proteicos), compostos principalmente por  $\alpha$ -sinucleína, ubiquitina, sinfilina e tubulina (SHIMURA et al., 2000). No entanto, a  $\alpha$ -sinucleína é o maior componente dos LBs, e mutações no gene que codifica para essa proteína têm sido associados com casos familiares dominantes de Parkinsonismo (POLYMEROPOULOS et al., 1997). No entanto, outras proteínas podem interferir no mecanismo de degradação e autofagia das células. Quando fosforilada, PINK1 recruta Parkina nas mitocôndrias danificadas pra serem degradadas, no entanto mutações em PINK1 ou Parkina (responsáveis pela maioria dos casos autossômicos recessivos), impedem a mitofagia, causando acúmulo de dano mitocondrial e iniciando apoptose (NIXON, 2013; OMURA et al., 2013).

As formas genéticas são raras em humanos, representando somente 10% dos casos totais da DP. No entanto, as formas genéticas são de grande importancia, para melhor entender a fisiopatología idiopática da DP, permitindo identificar fatores de risco e os sintomas iniciais, antes mesmo da fase de déficits motores (KLEIN & WESTENBERGER, 2012).

## 1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DP

Na tentativa de entender a fisiopatologia da DP e com a intenção de desenvolver terapias novas e mais eficientes, têm sido utilizados diferentes modelos animais (roedores ou primates não humanos) e celulares, os quais utilizam neurotoxinas ambientais, sintéticas ou expressão de genes mutantes vinculados ao desenvolvimento da DP em humanos. A seguir descrevem-se alguns dos modelos mais utilizados.

### ***1.3.1 Modelo experimental com 6-hidroxidopamina***

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é um análogo hidroxilado da DA que compartilha características estruturais com a DA e Noradrenalina, apresentando alta afinidade por vários transportadores catecolaminérgico como o transportador de DA (DAT) e o transportador de norepinefrina (NET) (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

Embora a estrutura da 6-OHDA seja similar à da DA, a presença do grupo hidroxila aumenta a toxicidade dessa molécula. Essa toxina não consegue atravessar a barreira hematoencefálica, motivo pelo qual é necessária sua injeção por estereotaxia diretamente na SNpc, Corpo Estriado ou feixe medial do procérebro para obter uma lesão desejada (COSTA et al., 2001; DEUMENS et al., 2002; BOVÉ et al., 2005). É aceito que a 6-OHDA destrói neurônios catecolaminérgicos pelo efeito combinado de EROs e quinonas tóxicas (produto de sua própria degradação) (BLESA et al., 2012). A magnitude da lesão depende da quantidade de 6-OHDA injetada, o sítio de injeção e a espécie animal utilizada. Esse modelo consegue levar à morte células dopaminérgicas, diminuir a quantidade de DA e modificar o comportamento animal. No entanto, nas características clínicas da DP em humanos outras estruturas encefálicas possam estar lesionadas, como *Locus Coeruleus* ou estruturas olfatórias, entretanto, nesse modelo animal não se observam tais alterações (BOVÉ & PERIER, 2012). 6-OHDA é considerada como uma possível toxina endógena, responsável pela iniciação dos processos neurodegenerativos da DP, como resultado do ataque de radicais hidroxila na

presença de DA (Blesa et al., 2012). No entanto a 6-OHDA não interage com  $\alpha$ -sinucleína e não induz a formação de estruturas tipo LBs (BLESA et al., 2012; BOVÉ & PERIER 2012).

### ***1.3.2 Modelo experimental com MPTP***

Em 1982, o MPTP foi acidentalmente descoberto, como um subproduto da síntese ilegal da desmetilprodina. Após o consumo via intravenosa, dependentes de drogas desenvolvem uma Síndrome Parkinsoniana idiopática gerada por drogas ilícitas. Depois de investigar a etiologia dessa condição, foi achado que o MPTP era o contaminante neurotóxico responsável pelos efeitos Parkinsonianos (BLESA et al., 2012). O MPTP é administrado sistemicamente, e rapidamente atravessa a barreira hematoencefálica. Uma vez no encéfalo, é captada primeiramente pelos astrócitos e transformada em MPP<sup>+</sup> (íon 1-metil-4-fenilpiridínio), seu metabolito tóxico, via monoamino oxidase- $\beta$ . MPP<sup>+</sup> é liberada para o espaço extracelular e captada por neurônios dopaminérgicos via DAT (PRZEDBORSKI et al., 2001; BLESA et al., 2012). Uma vez dentro dos neurônios, exerce um efeito tóxico inibindo o complexo mitocondrial I, resultando na liberação de EROs e na redução da síntese de ATP. (PRZEDBORSKI et al., 2001; DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

### ***1.3.3 Modelo experimental com Rotenona***

A Rotenona, uma molécula citotóxica natural, é utilizada na indústria agrícola como herbicida e inseticida, no entanto, sabe-se que sua exposição crônica pode induzir sintomas Parkinsonianos (LAPOINTE et al., 2004; SHERER et al., 2007). Foi reportado que a Rotenona pode inibir o complexo I da mitocôndria e despolimerização de microtubúlos, provocando grandes danos na célula (NEHRU et al., 2008; BOVÉ & PERIER, 2012). O uso de rotenona como modelo experimental, a pesar de apresentar alta mortalidade, é baseado na capacidade para reproduzir várias das características da DP como: aumento do estresse oxidativo, inibição da atividade proteossomal, degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos e formação de agregados proteicos ricos



em  $\alpha$ -sinucleína em neurônios dopaminérgicos, ricos em  $\alpha$ -sinucleína (WANG et al., 2006; OLANOW 2007; SHERER et al., 2007; BLESÁ et al., 2012).

### **1.3.4 Modelos Genéticos**

Acredita-se que somente 10% dos casos clínicos da DP são causados por alterações genéticas (SCHAPIRA, 2006; DIEDERICH & BALLING, 2011; BLESÁ et al., 2012). Diferentes pesquisas tem descoberto mutações gênicas que podem estar diretamente relacionados com a doença. Na atual nomenclatura genética, há 18 locus cromossômicos, denominados PARK, relacionados à formas dominantes ou recessivas da DP. Isso permitiu a geração de modelos animais genéticos para o estudo da DP. Os modelos genéticos apresentam um valor importante na comunidade científica para ajudar no entendimento de outras formas mais comuns da DP, com o fim desenvolver novos alvos terapêuticos, além de permitir estudar os sintomas iniciais da DP, antes que os déficits motores apareçam.

No entanto, nenhum modelo transgênico caracterizado até o momento, representa um modelo fidedigno para o estudo da DP, principalmente pela ausência na perda de neurônios dopaminérgicos (MAGEN & CHESSELET, 2010).

## **1.4 RETICULO ENDOPLASMÁTICO**

O Retículo Endoplasmático (RE) é uma organela multifuncional essencial na síntese, dobramento e processado de proteínas secretoras e transmembranas. As proteínas entram no RE como cadeias polipeptídicas desdobradas. A síntese de proteínas do RE é um processo co-traducional, isto quer dizer que as proteínas são importadas dentro do RE no mesmo momento em que estão sendo sintetizadas. Uma vez dentro, uma bateria de proteínas (chaperonas, foldasas e co-fatores) residentes do RE auxiliam nos processos pós-traducionais, para impedir a formação de agregados anormais, permitindo que proteínas sejam dobradas na conformação correta. No entanto, a síntese

proteica é um processo inerentemente imperfeito onde ocorrem erros em qualquer passo do processo. Para assegurar a fidelidade do processo, o RE tem desenvolvido várias vias de sinalização intracelular conhecida como UPR (do inglês, *Unfolded Protein Response*), uma resposta celular que reduz o influxo de proteínas novas sintetizadas, induz a superexpressão de genes que potenciam a capacidade de dobramento de proteínas, e ativam o processo de degradação proteica conhecido como ERAD (do inglês, *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) (MALHORTA & KAUFMAN, 2007; TSAI e WEISSMAN 2010; HETZ 2012). Todos esses processos devem ser regulados sincronizadamente para reestabelecer a homeostases e favorecer o dobramento proteico e a homeostases do RE. No entanto, se a célula é estressada intensamente e por um longo período de tempo, ela é incapaz de reparar a homeostase do RE, o que pode induzir uma resposta apoptótica (YOSHIDA et al., 2007; HETZ 2012)

A UPR tem evoluído como uma rede complexa de vias de sinalização que se desenvolve em múltiplas respostas celulares, mediadas pela ativação de três proteínas transmembrana, que funcionam como sensores de estresse: IRE1 (do inglês, *Inositol-Requiring protein 1*), PERK (do inglês, *Protein Kinase RNA-like ER kinase*) e ATF6 (do inglês, *Activating Transcription Factor 6*) (Figura 2). Em condições normais, esses sensores permanecem inativos interagindo com a proteína GRP78. Em células submetidas ao estresse de RE, GRP78 é dissociada das três proteínas sensoras transmembrana, promovendo a ativação dessas proteínas. Uma vez ativadas, IRE1 processa o mRNA de um fator de transcrição (XBP1) que gera a superexpressão de genes que codificam mediadores da ERAD, biogêneses de organelas e controle de qualidade de proteínas. PERK reduz a síntese geral de proteínas via fosforilação do fator eIF2a, que induz a síntese de ATF4, um fator de transcrição que ativa a expressão de genes envolvidos em apoptoses, autofagia e resposta antioxidante. ATF6 é transportado até o aparato de Golgi onde é clivado, e o domínio citoplasmático é transportado até o núcleo onde induz a expressão de chaperonas, proteínas envolvidas na biogêneses de organelos, e de genes relacionados a resposta ERAD (MARCINIAK & RON, 2006; YOSHIDA et al., 2007; HETZ, 2012).

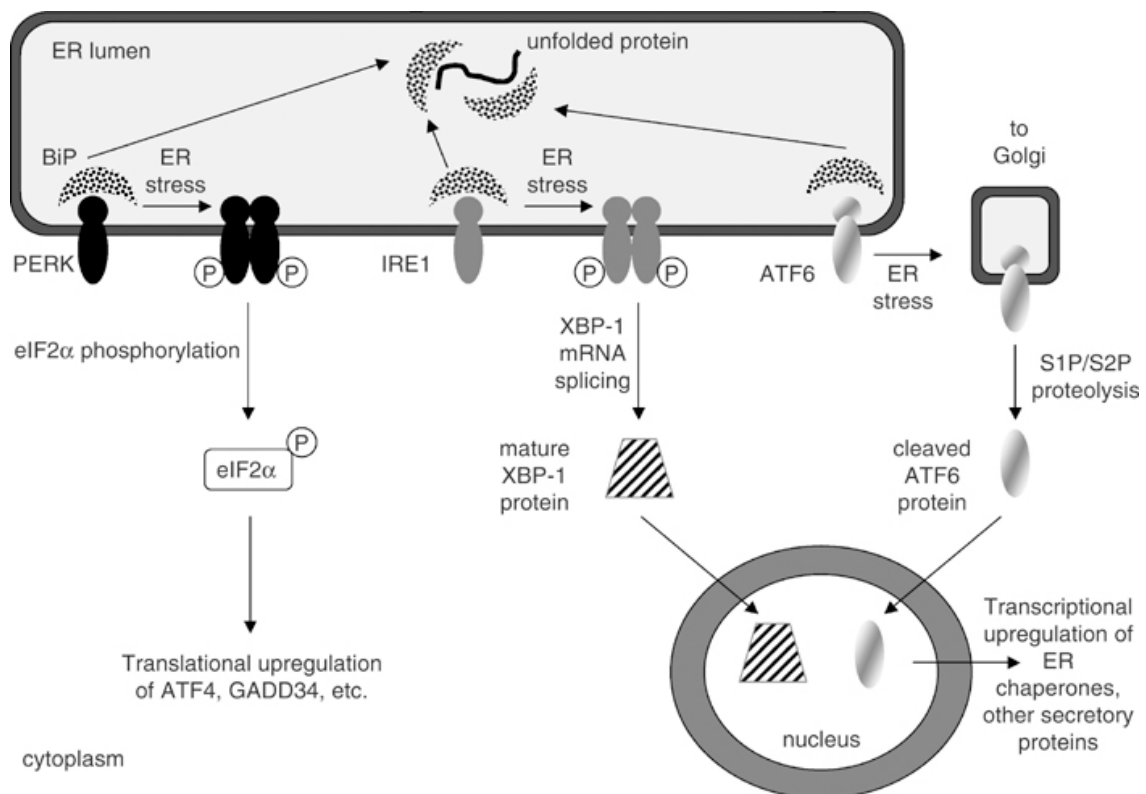


FIGURA 2. ESQUEMA DOS COMPONENTES DA RESPOSTA AO ESTRESSE DE RE EM MAMÍFEROS. PROTEÍNAS MAL DOBRADAS NO RE ATIVAM A UPR DESACOPLANDO A PROTEÍNA BIP (GRP78) DOS 3 SENSORES DO ESTRESSE DE RE: PERK, IRE1 E ATF6.

FONTE: BOYCE & YUAN (2006).

Várias substâncias tem sido utilizadas no estudo de estresse de RE, as quais atuam sobre diferentes alvos celulares, como: **Thapsigargin** (inibe bomba SERCA no RE), **Tunicamicina** (inibe N-glicosilação das proteínas em processo de síntese), **DTT** (quebra os enlaces dissulfeto das proteínas já sintetizadas), e **Befeldrina A** (bloqueia a formação de vesículas COPI, inibindo o transporte retrógrado, o qual seletivamente recicla proteínas do Golgi até o RE) (LEAVER et al., 1988; ORCI et al., 1991; RUTKOWSKI et al., 2006; CHATTOPADHYAY & VALENTINE, 2009). A Tunicamicina é um antibiótico que foi utilizado no tratamento do câncer, que devido à alta toxicidade foi eliminado como tratamento para essa doença. No entanto, são vários os estudos que tem demonstrado o poder da Tunicamicina, um inibidor da N-glicosilação das proteínas, na indução do estresse de RE e ativação da UPR em modelos *in*

*vitro* e *in vivo* (LEAVER et al., 1988; RUTKOWSKI et al., 2006; MATSUI et al., 2010).

### **1.4.1 Estresse de RE em Doenças Neurodegenerativas**

A maioria das doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela acumulo de agregados proteicos, os quais interferem com os processos celulares normais. A morte neuronal em doenças neurodegenerativas associadas a formas familiares ou esporádicas é acompanhada do mal dobramento e agregação de proteínas (BERKE e PAULSON 2003; SELKEO, 2003).

Modelos transgênicos de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), Alzheimer e Huntington originam alterações na estrutura do RE e acumulação de proteínas mal dobradas (REDDY et al., 1999; RAO et al., 2002; OH et al., 2008; SALMINEN et al., 2009). Estudos têm sugerido que a participação inicial da UPR nas doenças neurodegenerativas provavelmente tenha função citoprotectora e restauradora da homeostases do RE (RUTKOWSKI et al., 2006; YOSHIDA, 2007; ZHU et al., 2008). No entanto, quando a UPR é ativada por um longo período de tempo, e as células são incapazes de resolver o estresse, as vias apoptóticas são ativadas, o que agrava e possivelmente esteja associado com a patogêneses de várias doenças neurodegenerativas (DAWSON & DAWSON, 2003; BERNALES et al., 2012; LINDHOLM et al., 2006; MATSUI et al., 2012; CASTRO-CALDAS et al., 2012). Vários estudos sugerem que uma diminuição progressiva no funcionamento do sistema de chaperonas pode ser associado com o mal funcionamento celular e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (NAIDOO et al., 2008; BROWN & NAIDOO, 2012; MORAWAWE et al., 2012). Durante o processo do envelhecimento, existe uma diminuição na atividade e na resposta das chaperonas frente ao estresse de RE (NAIDO, 2009), aumentando a vulnerabilidade das pessoas idosas no processo do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento como Alzheimer, Parkinson ou Demência.

### **1.4.2 Estresse de RE em Doença de Parkinson**

O mecanismo pelo qual são formados os agregados ainda não é completamente compreendido, mas é conhecido que a conformação das proteínas para um estado que favorece a formação de agregados insolúveis, é tóxico para a célula. No caso da DP, sabe-se que a redução das células dopaminérgicas pode ser decorrente de diferentes mecanismos, incluindo excitotoxicidade, distúrbio homeostático do cálcio, inflamação, apoptose e agregação de proteínas (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; EMBORG, 2004). Embora o mecanismo exato que produz a degeneração dos neurônios dopaminérgicos é desconhecendo.

Baseado no estresse de RE como possível fator gerador de DP, alguns estudos sugerem que pesticidas como a Rotenona e Parquat (BOVÉ & PERIER, 2012), poderiam contribuir para o desenvolvimento da DP, possivelmente pelos mecanismos de estresse de RE, assim como outros efeitos adversos. Além disso, foi demonstrado o efeito protetor de TUDCA, uma chaperona química capaz de aumentar a capacidade de dobramento de proteínas, sobre os neurônios da SNpc, num modelo *in vivo* de DP (CASTRO-CALDAS et al., 2012). Essas evidências sugerem que o estresse de RE possa ser um mecanismo comum na geração das características patológicas da DP.

Até o momento, no estudo do estresse de RE na DP, só existe um modelo, em vertebrados inferiores (Medaka Fish), estudando a importância do estresse de RE na geração das características patogênicas e patognomônicas da DP (MATSUI et al., 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os modelos animais são de grande valia no meio científico, pois refletem características da doença, simulando alterações patológicas, histológicas e bioquímicas, bem como seus distúrbios funcionais. Pode ser discutível os méritos e as limitações de cada um dos modelos utilizados até o momento, na tentativa de compreender a fisiologia da DP e para desenvolver novas terapias. Dada a extrema importância do envolvimento do estresse do RE na geração de doenças neurodegenerativas, propõe-se nesse trabalho a geração de um modelo murino *in vivo* que estude o estresse do RE como possível fator no desenvolvimento de DP. Pretende-se nesse estudo avaliar se uma única injeção de Tunicamicina, um conhecido estressor do RE (LEAVER, et al., 1988), diretamente na SNpc é suficiente para estressar o RE e desenvolver as características fisiopatológicas da DP.

## 3. HIPÓTESES

O estresse de RE celular afeta diretamente e/ou indiretamente a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, sendo fator suficiente na geração de um modelo animal para o estudo da Doença de Parkinson.

## **4. OBJETIVOS**

### ***4.1 Objetivo geral***

Avaliar se o estresse de RE é necessário e suficiente na geração das características fisiopatológicas da DP.

### ***4.2 Objetivos específicos***

1. Caracterizar histopatologicamente a lesão na Substancia Negra gerada com o estresse de retículo endoplasmático.
2. Analisar o comportamento dos animais após lesão da SNpc por estresse de retículo endoplasmático.



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 58 ratos Wistar machos, obtidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Todo procedimento realizado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, de acordo com o Anexo I (número 778). Os animais foram distribuídos em 3 grupos diferentes: Controle (PBS-DMSO - Sigma Chemical Co., USA- n=18), Experimental (injetados com Tunicamicina - Sigma Chemical Co., USA- 0,1µg, n=22) e Controle Positivo Experimental (injetados com 6-OHDA -Sigma Chemical Co., USA- 1µg, n=18), que representa o modelo de Parkinson bem estabelecido na literatura. Os animais foram mantidos em caixas com até 5 animais, em sala com exaustão de ar, com iluminação 12hs/12hs (com ciclo claro das 07hs às 19hs), e com alimentação e água *ad libitum*.

### 5.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram profundamente anestesiados com quetamina (i.p., 100mg/Kg) e xilazina (i.p., 20mg/kg). Os mesmos foram fixados no estereotáxico e a área sobre o crânio foi tricotomizada e limpa com álcool, antes de ser realizado o corte com bisturi. Após o corte, um orifício foi perfurado no crânio sobre a área de interesse, por onde se foi inserida a agulha para realização das microinjeções dos compostos já mencionados na SNpc (antero-posterior: 0,5 mm, latero-lateral: 0,21 mm e dorso-ventral: 0,78 mm). Para obter as coordenadas estereotáxicas foi utilizado o atlas de encéfalo de

rato Paxinos & Watson (PAXINOS & WATSON, 1997). Após cirurgia, os animais foram mantidos para recuperação da anestesia em sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C ), e tratados com anestésico meloxicam (i.p., 5 mg/kg) por 24 horas.

## 5.3 COMPORTAMENTO

Por isso achamos necessário o emprego de modelos comportamentais com a ideia de observar se o nosso modelo é capaz de gerar características da doença a nível comportamental. Para o estudo de um possível déficit locomotor, utilizamos dois testes diferentes: (1) Campo Aberto e (2) Footprint.

### 5.3.1 *Campo aberto*

Este teste avalia a atividade motora do animal em ambiente com estímulo luminoso. O teste é realizado em uma arena circular com 100 cm de diâmetro, fechada com paredes laterais com 40 cm de altura, iluminada por lâmpada de 100 watts e cujo piso encontra-se marcado por um círculo central, circundado por dezoito quadrantes periféricos. Os animais são colocados na região central da arena para explorar o ambiente durante 5 minutos. Nesse teste foi quantificada: a distância percorrida, total e pelas regiões subdivididas pelos quadrantes em central, periférica e borda, assim como o tempo em cada região, e as velocidades máxima e mínima atingida pelos animais. Esses dados foram capturados por meio de uma câmera acoplada ao software Smart Junior (Panlab - Harvard, Espanha). Além disso, foi quantificado o número de vezes que o animal se levante para explorar o ambiente (*rearing* - comportamento exploratório), o número de eventos de limpeza (*grooming*), o número de fezes, e de comportamento de medo, quando o animal fica totalmente parado (*freezing*) (BUCCAFUSCO 2001; NALIWAIKI et al., 2004).

### **5.3.2 Footprint**

Este teste é utilizado para avaliar coordenação motora e equilíbrio dos animais. O teste foi escolhido devido à eficiência para observar defeitos associados a lesão e envelhecimento, e por ser uma técnica económica, fácil de configurar e de realizar, permitindo desta forma que o operador influa o menos possível na conduta dos animais (CARTER et al., 1999). O footprint examina o andar dos animais permitindo avaliar anomalias locomotoras mediante o análise das pegadas dianteiras e traseiras. Para realização da amostragem, as patas dos animais são pintadas com tinta não tóxica, à base de água (utilizando-se uma cor para as patas dianteiras e outra cor para as patas traseiras). Os dados são utilizados quando o animal é capaz de atravessar em linha reta, dando pelo menos 4 passos sem interrupção (CARTER et al., 1999; PALLIER et al., 2009), em uma pista de 100 cm de comprimento por 10 cm de largura, com paredes de 40 cm. Os animais foram submetidos a este teste após 7 dias após a lesão. Antes de realizar o teste, os animais tiveram 5 minutos para explorar e reconhecer o ambiente (PALLIER et al., 2009). Após o reconhecimento, as patas dos animais foram pintadas, e imediatamente introduzidos numa das extremidades da pista, onde se encontra acesa uma luz, para que o animal caminhe até o outro lado sobre um papel branco que cobria a pista, deixando pegadas de diferentes cores. O papel logo foi retirado para o análises do comprimento (distancia entre marcas dianteiras e traseiras) e largura (distancia entre marcas esquerdas e direitas) das pegadas.

## **5.4 PERFUSÃO E OBTENÇÃO DO ENCÉFALO PARA ANÁLISE**

Os animais foram profundamente anestesiados com quetamina (i.p., 100mg/Kg) e xilazina (i.p., 20mg/kg), e perfundidos por via transcardíaca. Uma vez profundamente anestesiados, coloca-se o animal em decúbito-dorsal sobre a mesa de perfusão, uma incisão abdominal abaixo da margem costal foi realizada, o diafragma foi cortada e as costelas foram cortadas, removendo o

peitoral esternocostal, expondo o coração. O átrio direito foi cortado para deixar sair o sangue e líquidos perfundidos; no ventrículo esquerdo foi inserida uma seringa, a qual estava conectada com uma bomba de perfusão, em fluxo constante de 11 mL/minuto. Primeiro foi injetada solução de lavagem (PBS 0,1M - 3,18g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 10,94g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , QSP 1L de água destilada, pH 7,2) e solução de fixação depois (Paraformaldehído 4%). Encéfalos foram removidos e incubados 24 horas, a 4°C, em paraformaldehído 4%, e então imersos por mais 72 horas em solução tamponada de sacarose 30%, para criopreservação. Os encéfalos foram mantidos a -80°C até serem seccionados em cortes coronais de 30 mm de espessura em criostato Leica a -20°C. Os cortes foram coletados em solução *anti-freezing* (500mL PBS 0,1M, 500mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,59g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5,47g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300g sacarose, 300mL etilenoglicol) e armazenados a -20°C até o seu processamento para imuno-histoquímica.

## 5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para o processamento de imuno-histoquímica, os cortes foram lavados três vezes de 10 minutos com PBS 0,1M, e em seguida com  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 vol. diluída a 3% em PBS 0,1M. Após nova lavagem com PBS 0,1M por 10 min, os cortes foram incubados por 30 minutos, em solução de bloqueio (5% soro fetal bovino, 0,1% tritón X-100 em PBS 0,1M). A seguir, os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio *over-nigth* em câmara fria. No dia seguinte, os tecidos foram lavados 3 vezes por 10 minutos e incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2h, sempre em agitação constante. Depois os tecidos foram incubados com *Avidina-Biotina Complex*, seguido da revelação com DAB (de acordo com instruções do fabricante). Após a reação, os cortes foram lavados 5 vezes por 10 min em PBS 0,1M desidratados em Álcool e Xilol, montados em lâminas e finalmente cobertos com lamínulas utilizando-se Entellan® (Merk). Os tecidos foram visualizados em microscópio Carl Zeiss Axio Observer acoplado ao software Axio Vision 4.8.2. A nomenclatura e os limites das estruturas encefálicas foram definidos de acordo com Paxinos (PAXINOS & WATSON, 1997). Foram realizadas

imuno-histoquímica com anticorpos primários: anticorpo monoclonal de camundongo anti-tirosina hidroxilase (1:750, Sigma), anticorpo monoclonal de coelho anti-GFAP (1:600, Dako), anticorpo monoclonal de camundongo anti-OX-42 (1:1000, Axyl), anticorpo monoclonal de camundongo anti-caspase-3 ativada (1:500, CellSignaling).

## **5.6 WESTERN BLOT**

Esta é uma técnica de rotina nos laboratórios de pesquisa biológica, que permite o estudo da expressão de proteínas numa amostra biológica, permitindo examinar a quantidade de proteínas numa amostra e comparar o níveis de proteínas entre vários grupos. Para isto, baseado no tamanho, as proteínas são separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida. Para migrar, as proteínas são desnaturadas e expostas ao dodecil sulfato de sódio (SDS) para ser carregadas negativamente. Assim, quando aplicado um campo elétrico, as proteínas migram pelo gel desde o polo negativo até o polo positivo. A quantidade de SDS unida na proteína é relativa ao tamanho da mesma, então as proteínas tem uma carga similar em relação à massa molecular. Uma vez que as amostras migram no gel, as proteínas ficam divididas em bandas separadas em base à massa molecular.

### ***5.6.1 Obtenção de amostras para western blot***

Os animais foram sacrificados sem anestesia por decapitação. Após serem sacrificados, o cérebro foi retirado e colocado em PBS gelado. O cérebro foi dissecado manualmente baixo lupa, e os núcleos da base foram retirados, e coloca-los em tubos eppendorf contendo buffer de lisis: 2mM EDTA, 50mM NaCl, 50mM HEPES, 1% Tritón X-100 e inibidores de proteases Complete (Roche). Essas amostras foram homogeneizadas manualmente e centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. A concentração de proteínas do sobrenadante foi quantificado pelo método de Bradford.

### **5.6.2 Dosagem de Proteínas**

A dosagem de proteínas será realizada pelo método de Bradford Kit Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, Waltham, USA), em leitor de placas de 96 wells (Meridian ELX 800). A curva padrão será construída com diferentes concentrações (0 µg/mL – 200 µg/mL) de Soro Albumina Bovina (BSA) e as amostras serão diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. Sendo a leitura realizada em 595 nm.

### **5.6.3 Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida**

Para a separação de proteínas por eletroforese foram construídos mini-géis de poliacrilamida 12%. Os géis estão conformados por 2 partes: gel separador (para 1 gel:  $H_2O_{dest}$  3,3ml; *acrilamida* 30% 4,0ml; *Tris* 1,5M (pH8,8) 2,5ml; *SDS*10% 0,1ml; *APS*10% 0,1ml; *TEMED* 0,004ml) e gel concentrador (para 1 gel:  $H_2O_{dest}$  1,4ml; *acrilamida* 30% 0,33; *Tris* 1,5M (pH8,8) 0,25ml; *SDS*10% 0,02ml; *APS*10% 0,02ml; *TEMED* 0,002ml). A função do gel concentrador é concentrar as proteínas das amostra e permitir que a entrada no gel separador das proteínas aconteça no mesmo momento para todas as amostras. Isso tem como resultado que todas as proteínas sejam separadas unicamente por suas diferenças de tamanho e não pelo momento no qual tenham entrado no gel separador.

Os géis foram colocados no suporte dentro da cuba de eletroforese (BioRad) e foi adicionado buffer de corrida (3,03 gr Tris; 14,42 gr Glicina; 1,0 gr SDS; 1000 ml  $H_2O_{dest}$ ; pH 8,4). Utilizando pipeta Hamilton, foi adicionado 5 µl de marcador de peso molecular (#26621, Thermo), e nos restantes poços foi carregado um volume determinado para 30 µg de proteínas totais das amostras para analisar. A corrida de electroforese foi realizada a 50 mA e intensidade de corrente livre.

### **5.6.4 Transferência**

As proteínas tem que ser acessíveis para o reconhecimento por anticorpos. Para isso, as proteínas foram transferidas desde o gel de poliacrilamida até uma membrana de nitrocelulose. Esse processo utiliza o

mesmo princípio ad eletroforese, mas nesse caso a corrente elétrica é aplicada em paralelo à posição do gel, desse jeito as proteínas migram fora do gel até a membrana. O 'sandwich' para a transferência foi armado submerso em buffer de transferência (3,03 gr Tris; 14,4 gr Glicina; 200 ml de Metanol; 800 ml  $H_2O_{dest}$ ) aplicando os componentes na seguinte ordem (do polo negativo ou cátodo, até o positivo ou anodo): esponja, 3 folhas de papel filtro, gel, membrana, 3 folhas de papel filtro e outra esponja. As proteínas são transferidas desde o polo positivo até o negativo, quedando aderidas na membrana de nitrocelulose. O 'sandwich' é colocado na cuba de transferência, submerso em buffer de transferência. Como o processo leva ao aquecimento da solução, o dispositivo foi refrigerado circulando o buffer com agitador magnético. A transferência foi realizada durante 75 minutos a 300mA com voltagem livre. Uma vez terminada, a membrana foi retirada e submersa em uma solução de vermelho Ponceau (0,2% vermelho Ponceau e 3% ácido tricloroacético em  $H_2O_{dest}$ ) durante 2 minutos com intenção de comprovar a transferência das proteínas desde o gel até a membrana. O vermelho Ponceau cora de forma inespecífica todas as proteínas da amostra, e pode ser retirado da membrana ao lavar com TBS-Tween 0,1%.

#### ***5.6.5 Bloqueio da membrana e incubação com anticorpos***

O bloqueio da membrana é importante no Western blot para reduzir a união inespecífica dos anticorpos na membrana, evitando desse jeito falsos positivos. Para isso, uma vez que as proteínas foram transferidas, a membrana foi bloqueada 1 hora a temperatura ambiente (TA) em uma solução de leite desnatado ou BSA (albumina de soro bovino) 5% em TBS-Tween 0,1% com agitação leve. Uma vez terminado o tempo, a membrana foi incubada a 4°C *over-night* em solução de bloqueio com anticorpos primários: anticorpo monoclonal de camundongo anti- $\alpha$ -actina (1:4000, Sigma), anticorpo monoclonal de coelho anti-PDI (1:1500, Sigma), anticorpo monoclonal de coelho anti-KDEL (1:1000, Enzo Life Science), anticorpo policlonal de coelho anti-NF- $\kappa$ B (1:2000, Santa Cruz), anticorpo monoclonal de camundongo anti-TH (1:10,000, Sigma), anticorpo monoclonal de camundongo anti-Caspase-3-Ativada (1:500, Cell Signaling).



Após a incubação do anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-Tween 0,1% (3 X 5 minutos). Uma vez concluída a etapa de lavados, a membrana foi incubada durante 1 hora a TA com anticorpos secundários: anti-IgG coelho-HRP (1:4000, B&D) ou anti-IgG camundongo-HRP (1:4000, B&D), também incubados em solução de bloqueio. Uma vez transcorrido o tempo, a membrana foi lavada com TBS-Tween 0,1% (3 X 5 minutos), e foi revelada.

### **5.6.6 Revelado**

Para o revelado das proteínas presentes na membrana, foi utilizado o sistema ECL (ECL 32106 Pierce, Thermo Scientific), devido à sua alta sensibilidade. Este sistema também tem a capacidade de gerar um contraste excelente dos sinais gerados. Para o revelado foram utilizados anticorpos conjugados com enzima HRP (peroxidase de rabanete). A reação quimioluminescente ocorre quando a energia de uma reação química é emitida como luz. A peroxidase de rabanete é utilizada para catalisar a oxidação do luminol (ECL reagente de detecção 2) na presença de  $H_2O_2$  (ECL reagente de detecção 1). Após a oxidação, o luminol está num estado excitado, e passa para um estado basal, onde emite luz. Quando a reação ocorre sobre um filme autorradiográfico, é obtida uma impressão devido a que a luz impressiona os grão de prata do film.

A membrana foi incubada com ambas soluções ECL em quarto escuro por 1 minuto. O sobranete de ECL foi retirado, e a membrana entrou em contato com um filme autorradiográfico (Fujifilm) em um cassette por 5 minutos e revelado com a soluções revelador e fixador comerciais (Kodak).

## **5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Todos os dados serão avaliados usando-se o software STATISTICA (versão 7.0). Os dados serão avaliados por ANOVA de 1 vía seguido pelo teste *a posteriori* de Fisher, tomando como significativo um  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RE NA SNpc

Com o objetivo de gerar um modelo de DP baseado no estresse de RE, primeiramente foi comprovada a existência de estresse de RE após a lesão na SNpc. Para isso foram analisadas por Western blot amostras da SN de animais dos três grupos (Controle, Tunicamicina e 6-OHDA). Os resultados obtidos permitiram observar um aumento na expressão de marcadores prototípicos de estresse de RE (GRP78, GRP94) (FIGURA 3A).

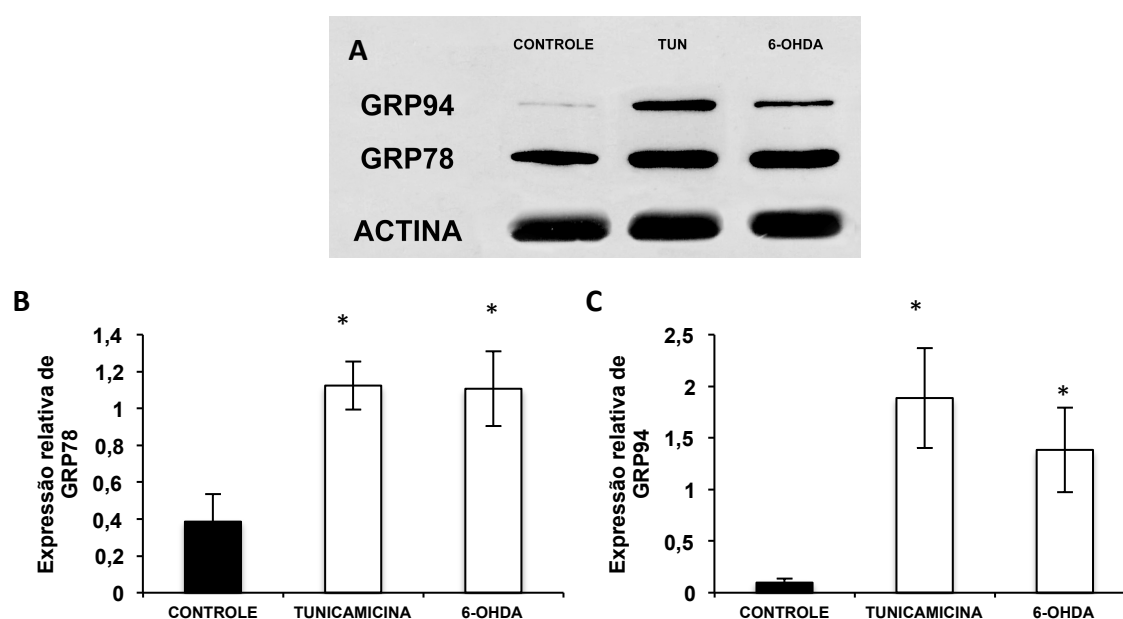


FIGURA 3.- ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE GRP94 E GRP78 NA SN. A) WESTERN BLOT DE EXTRATOS PROTEICOS DE SN DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA, USANDO ANTICORPOS ANTI- KDEL E ACTINA. B) QUANTIFICAÇÃO POR DENSITOMETRIA DO RESULTADO OBTIDO PARA GRP78. C) QUANTIFICAÇÃO POR DENSITOMETRIA DO RESULTADO OBTIDO PARA GRP94. DADOS DA DENSITOMETRIA NOS GRÁFICOS ESTÃO NORMALIZADOS PARA DENSITOMETRIA DAS BANDAS DE ACTINA. \* ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO TESTE DE FISHER COMO *POST-HOC*, TOMANDO-SE COMO SIGNIFICANTE  $P \leq 0,05$ . CONTROLE: N=6; TUNICAMICINA: N=4; 6-OHDA: N=6.

O análise do western blot demonstrou um aumento na expressão de GRP78 de 2,9 vezes para o grupo Tunicamicina, e de 2,86 vezes para o grupo 6-OHDA quando comparado ao grupo controle (FIGURA 3B). Também foi observado um aumento de 19 vezes e 14 vezes na expressão de GRP94 para os grupos Tunicamicina e 6-OHDA respectivamente, quando comparados com o grupo controle (Figura 1C).

No entanto, não foi observada diferença na expressão da proteína PDI (outra chaperona do RE) entre os 3 grupos analisados (FIGURA 4).

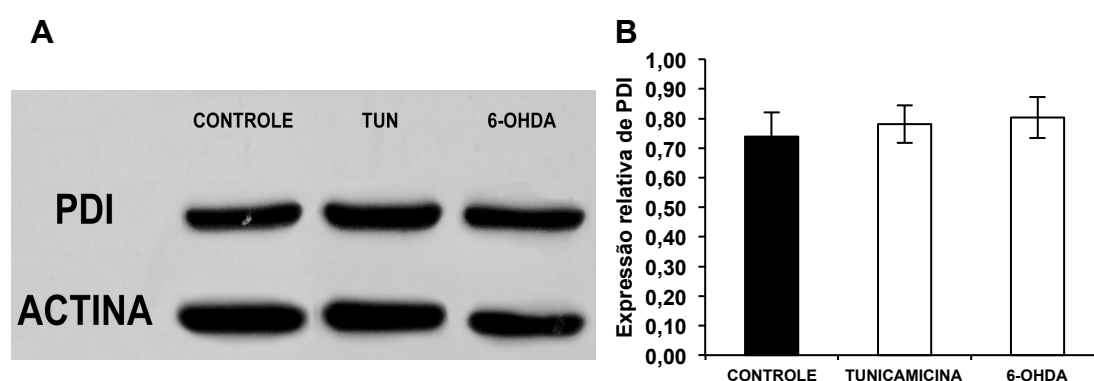


FIGURA 4.- ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE PDI NA SN. A) WESTERN BLOT DE EXTRATOS PROTEICOS DE SN DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA, USANDO ANTICORPOS ANTI- PDI E ACTINA. B) QUANTIFICAÇÃO POR DENSITOMETRIA DO RESULTADO OBTIDO PARA PDI. DADOS DA DENSITOMETRIA NOS GRÁFICOS ESTÃO NORMALIZADOS PARA DENSITOMETRIA DAS BANDAS DE ACTINA. ANOVA DE 1 VÍA. N=3 ANIMAIS/GRUPO.

## 6.2 AVALIAÇÃO DE DANO CELULAR NA SNpc

Com a intenção de avaliar se uma alteração na homeostase do RE é estímulo suficiente para gerar algumas das características patológicas observadas na DP, primeiro foi observada reativação glial por imuno-marcação para astrocitos e microglia (GFAP e OX-42, respectivamente) (FIGURA 5).

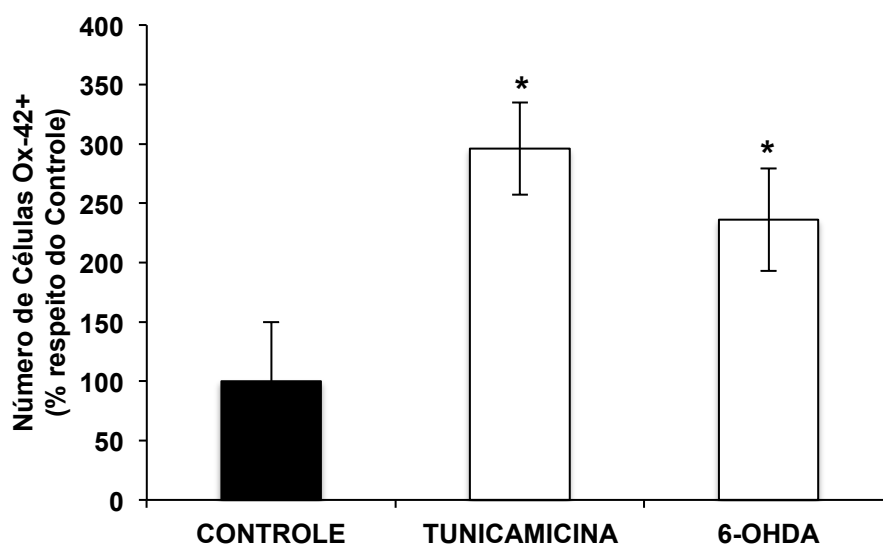
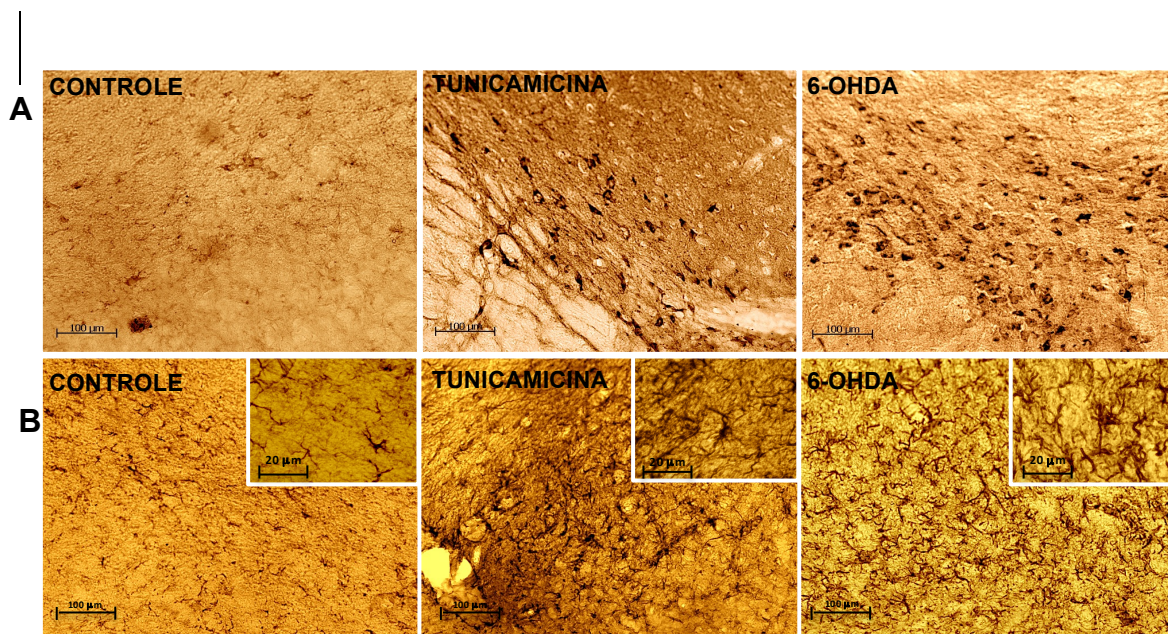


FIGURA 5.- ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DA SNPC PARA MARCAÇÕES DE GFAP E OX42. FOTOMICROGRAFIAS DE FATIAS TRANSVERSAIS DE ENCÉFALOS DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA, DISPOSTAS NESSA ORDEM, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, IMUNOMARCADAS PARA A) OX-42 E B) GFAP. PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE DO NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POSITIVAMENTE PARA C) OX-42. \* ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO TESTE DE FISHER COMO *POST-HOC*, TOMANDO-SE COMO SIGNIFICANTE  $P \leq 0,05$ .

(OX-42: CONTROLE: N=3; TUNICAMICINA: N=4; 6-OHDA: N=4).

(GFAP: CONTROLE: N=3; TUNICAMICINA: N=4; 6-OHDA: N=4).

Como se pode observar nas Figuras 5A e 5B, a SNpc de animais injetados com 6-OHDA e Tunicamicina apresentaram um aumento, quando comparado ao grupo Controle, no número de micróglia (Ox-42+) e de astrócitos (GFAP+), indicando um processo de recrutamento e ativação glial para o local da injeção, persistente pelo menos até 7 dias. O aumento no número de microglia nos animais do grupo 6-OHDA foi de 2,4 vezes maior e o grupo Tunicamicina, 3 vezes maior quando comparados grupo controle (FIGURA 5C). Nos tecidos também foi observado um importante recrutamento e ativação astrocitária devido a importante marcação para GFAP, não foi quantificada devido a complexidade na identificação de células isoladas que permitiria a contagem.

Dado o aumento de células gliais no local da administração, tanto de tunicamicina quanto de 6-OHDA, a funcionalidade dessas células no local foi observada pelo aumento na expressão da proteína NF- $\kappa$ B. Alguns trabalhos têm mostrado que diferentes inibidores da via NF- $\kappa$ B são capazes de frear a progressão da DP (GOSH et al., 2007; QUIAN et al., 2010). Essa proteína atua como fator de transcrição, ativando a expressão de genes associados com a resposta inflamatória. A expressão de NF- $\kappa$ B foi analisada por Western blot, onde foi encontrado um aumento de 2 vezes os níveis de expressão nos grupos Tunicamicina e 6-OHDA, quando comparados aos animais controle (FIGURA 6), indicando a existência de uma resposta inflamatória na SNpc.

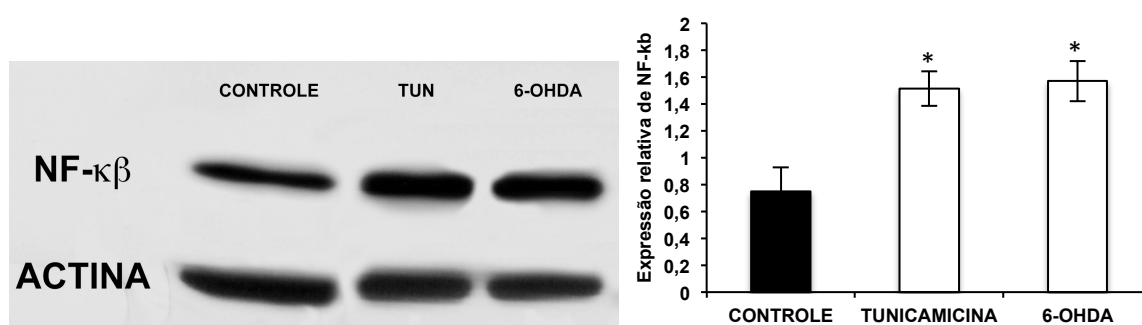


FIGURA 6.- ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE NF- $\kappa$ B NA SN. A) WESTERN BLOT DE EXTRATOS PROTEICOS DE SN DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA, USANDO ANTICORPOS ANTI- NF- $\kappa$ B E ACTINA. B) QUANTIFICAÇÃO POR DENSITOMETRIA DO RESULTADO OBTIDO PARA NF- $\kappa$ B. DADOS DA DENSITOMETRIA NOS GRÁFICOS ESTÃO NORMALIZADOS PARA DENSITOMETRIA DAS BANDAS DE ACTINA. \*ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO TESTE DE FISHER COMO *POST-HOC*, TOMANDO-SE COMO SIGNIFICANTE  $P \leq 0,05$ . N=3 ANIMAIS/GRUPO.

Uma vez confirmada a reativação glial e o aumento nos níveis de NF- $\kappa$ B, tornou-se interessante, então avaliar a sobrevivência celular no local da injeção e a possível lesão gerada. A Figura 7 mostra que essa ativação glial foi acompanhada por um aumento estatisticamente significativo de células marcadas positivamente para Caspase-3 ativada na SNpc, em animais tratados com 6-OHDA quando comparados ao grupo Controle.

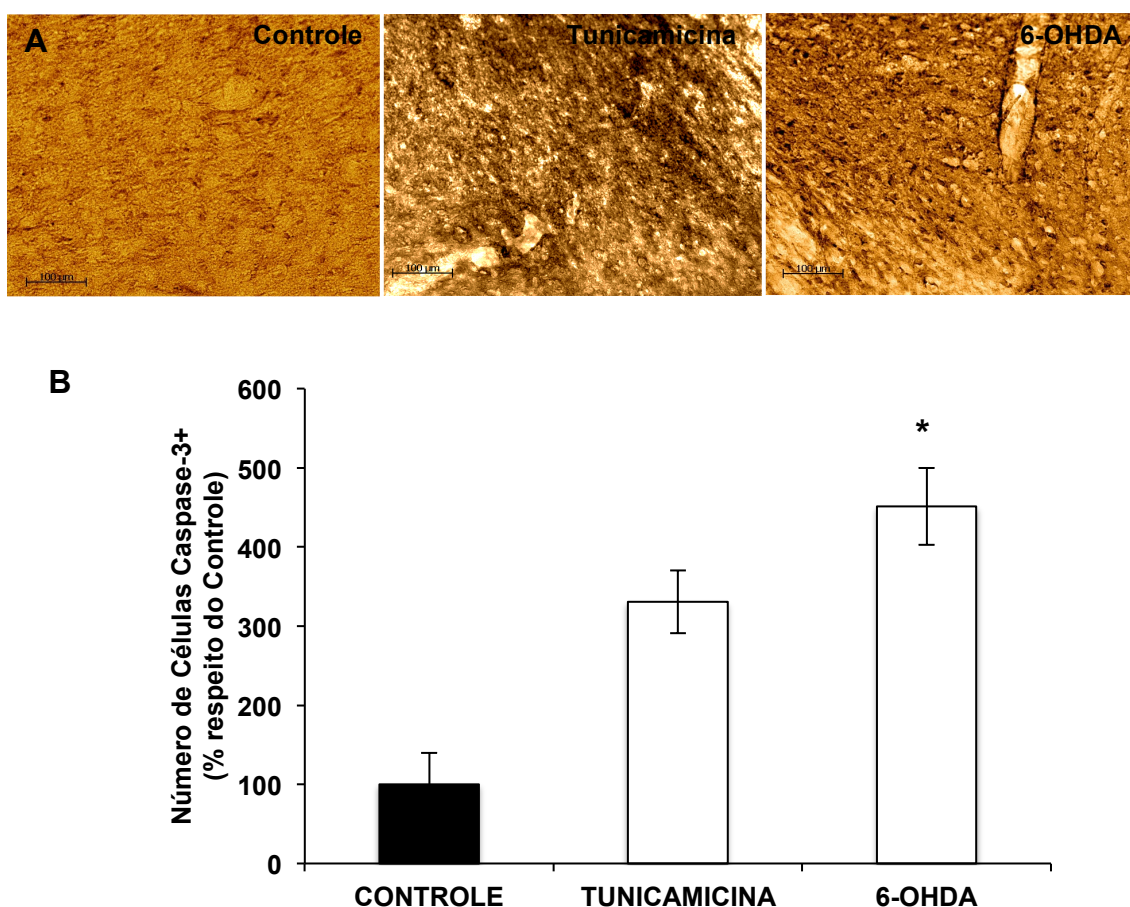


FIGURA 7.- ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DA SNPC PARA MARCAÇÕES DE CASPASE-3 ATIVADA. A) FOTOMICROGRAFIAS DE FATIAS TRANSVERSAIS DE ENCÉFALOS DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA, DISPOSTAS NESSA ORDEM, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, IMUNOMARCADAS PARA CASPASE-3 ATIVADA. B) PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE DO NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POSITIVAMENTE PARA CASPASE-3 ATIVADA. \*ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO TESTE DE FISHER COMO *POST-HOC*, TOMANDO-SE COMO SIGNIFICANTE  $P \leq 0,05$ . N=3 ANIMAIS/GRUPO.

Esse dado também foi confirmado por Western blot (FIGURA 8). Todos esses dados mostraram que até pelo menos 7 dias da lesão, ainda permanecem sinais de degeneração observadas pela ativação glial e pela presença de caspase-3 ativada em células que ainda estão em processo de apoptose.

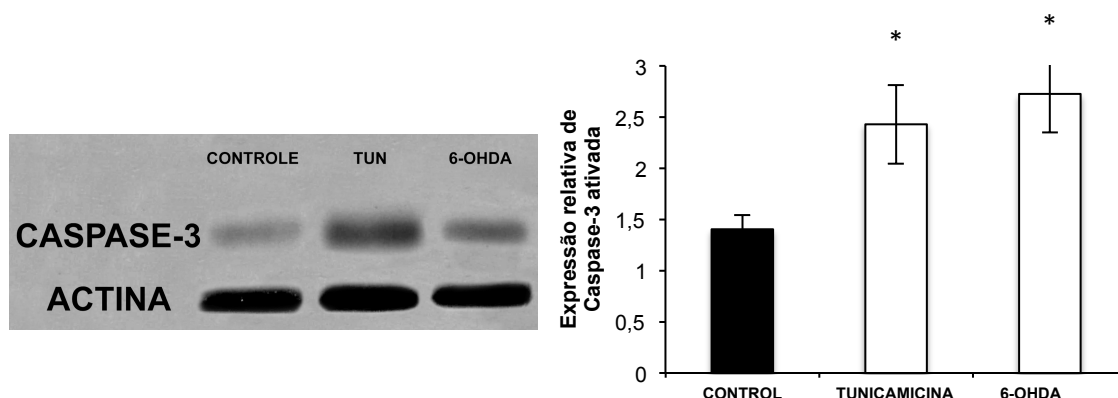


FIGURA 8.- ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE CASPASE-3 ATIVADA NA SN. A) WESTERN BLOT DE EXTRATOS PROTEICOS DE SN DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA, USANDO ANTICORPOS ANTI- CASPASE-3 ATIVADA E ACTINA. B) QUANTIFICAÇÃO POR DENSITOMETRIA DO RESULTADO OBTIDO PARA CASPASE-3 ATIVADA. DADOS DA DENSITOMETRIA NOS GRÁFICOS ESTÃO NORMALIZADOS PARA DENSITOMETRIA DAS BANDAS DE ACTINA. \* ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO TESTE DE FISHER COMO *POST-HOC*, TOMANDO-SE COMO SIGNIFICANTE  $P \leq 0,05$ . N=3 ANIMAIS/GRUPO.

## 6.3 EXPRESSÃO DE TH – SOBREVIDA DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS

Dado o processo inflamatório local e o aumento dos níveis de caspase-3 ativada na SN apresentados nos gráficos anteriores, fez-se necessário investigar a ocorrência e especificidade das morte celulares, em especial dos neurônios dopaminérgicos. A perda de neurônios dopaminérgicos uma das características da DP. A partir do análise dos resultados da imunohistoquímica, observamos que não houve diferença no número de neurônios dopaminérgicos



entre os grupos analisados, tanto pela quantificação do número de neurônios dopaminérgicos (FIGURA 9), quanto pelos níveis de expressão de TH na SN (FIGURA 10).

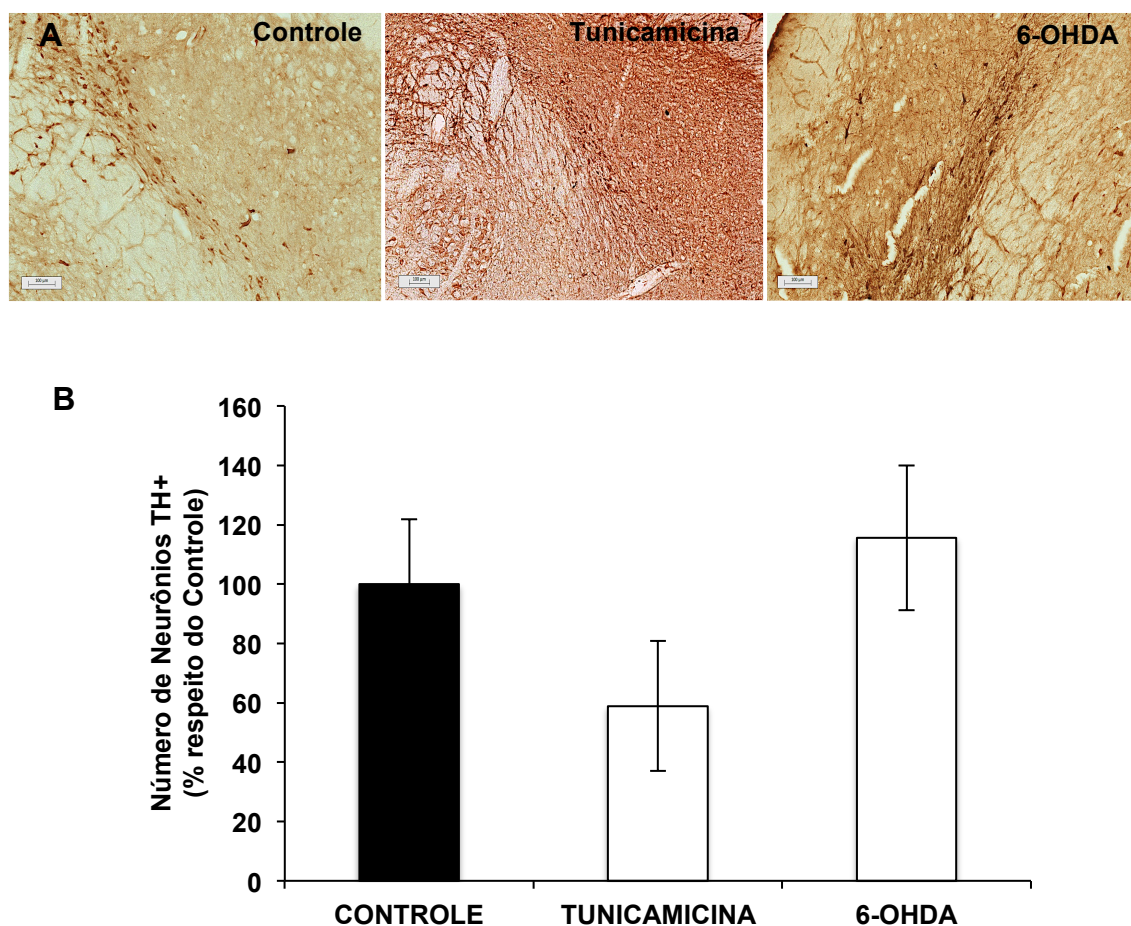


FIGURA 9.- ANÁLISE POR IMUNO-HISTOQUÍMICA DA SNPC PARA MARCAÇÕES DE TH. A) FOTOMICROGRAFIAS DE FATIAS TRANSVERSAIS DE ENCÉFALOS DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA, DISPOSTAS NESSA ORDEM, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, IMUNOMARCADAS PARA TH. B) PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE DO NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS POSITIVAMENTE PARA TH. N=3 ANIMAIS/GRUPO.

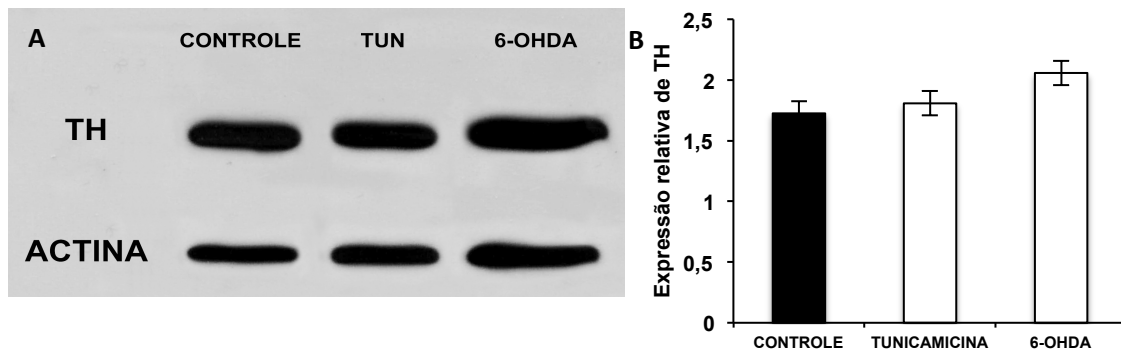


FIGURA 10.- ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE TH NA SN. A) WESTERN BLOT DE EXTRATOS PROTEICOS DE SN DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA, USANDO ANTICORPOS ANTI- TH E ACTINA. B) QUANTIFICAÇÃO POR DENSITOMETRIA DO RESULTADO OBTIDO PARA CASPASE-3 ATIVADA. DADOS DA DENSITOMETRIA NOS GRÁFICOS ESTÃO NORMALIZADOS PARA DENSITOMETRIA DAS BANDAS DE ACTINA. \* ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DO TESTE DE FISHER COMO *POST-HOC*, TOMANDO-SE COMO SIGNIFICANTE  $P \leq 0,05$ . N=3 ANIMAIS/GRUPO.

## 6.4 EFEITOS DA TUNICAMICINA E 6-OHDA SOBRE O COMPORTAMENTO

Com a intenção de saber se a lesão gerada na SNpc foi capaz de gerar alterações comportamentais, principalmente locomotoras, foram realizados 2 testes comportamentais 7 dias após lesão: 1) Campo Aberto e 2) Footprint.

### 6.4.1 *Campo aberto*

No campo aberto, os animais que receberam tunicamicina apresentaram aumento no comportamento exploratório (*rearing*) quando comparados aos animais tratados com 6-OHDA e aumento no comportamento de auto-limpeza (*grooming*) quando comparados aos animais do grupo 6-OHDA e Controle. No entanto, os outros parâmetros medidos não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos (FIGURA 9).

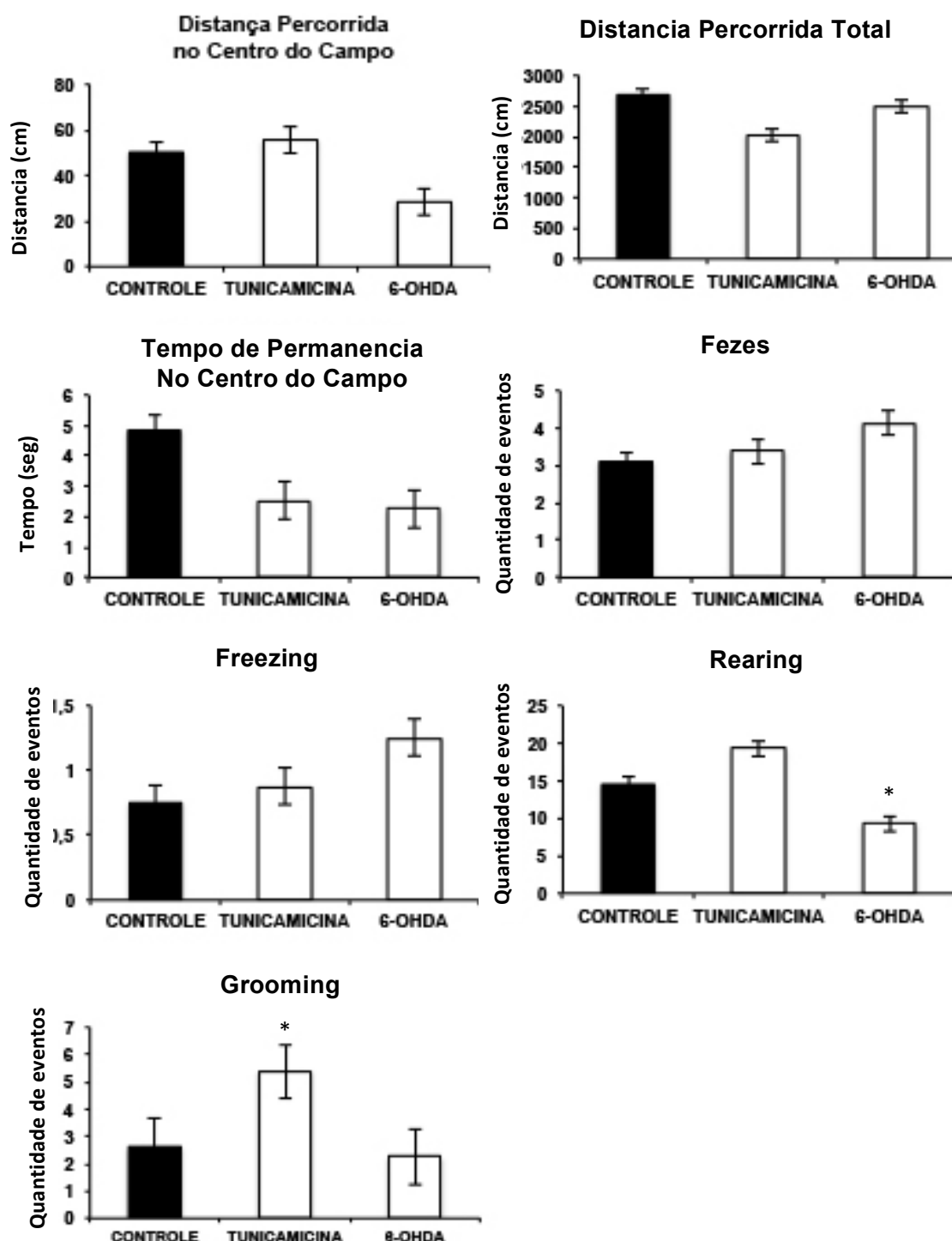


FIGURA 11.- ANÁLISE DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO CAMPO ABERTO. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA. ESTÃO AQUI PLOTADAS AS ANÁLISES DE: DISTÂNCIA PERCORRIDA TOTAL E NO CENTRO DO CAMPO, FREEZING, TEMPO DE PERMANÊNCIA NO CENTRO DO CAMPO, QUANTIDADE DE FEZES, QUANTIDADE DE *REARINGS* E QUANTIDADE DE *GROOMINGS*. \* ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DE TESTE DE *POST-HOC* DE FISHER,  $P \leq 0,05$ . CONTROLE: N=10; TUNICAMICINA: N=8; 6-OHDA: N=8.

### 6.4.2 Footprint

Apesar do teste de campo aberto não ter dado diferenças estatísticas em padrões relacionados especificamente com aspectos locomotores, a análise do teste de footprint demonstrou que animais dos grupos Tunicamicina e 6-OHDA apresentaram aumento na distância (largura) entre as patas traseiras ao caminharem, quando comparados aos dados dos animais controle (Figura 10).

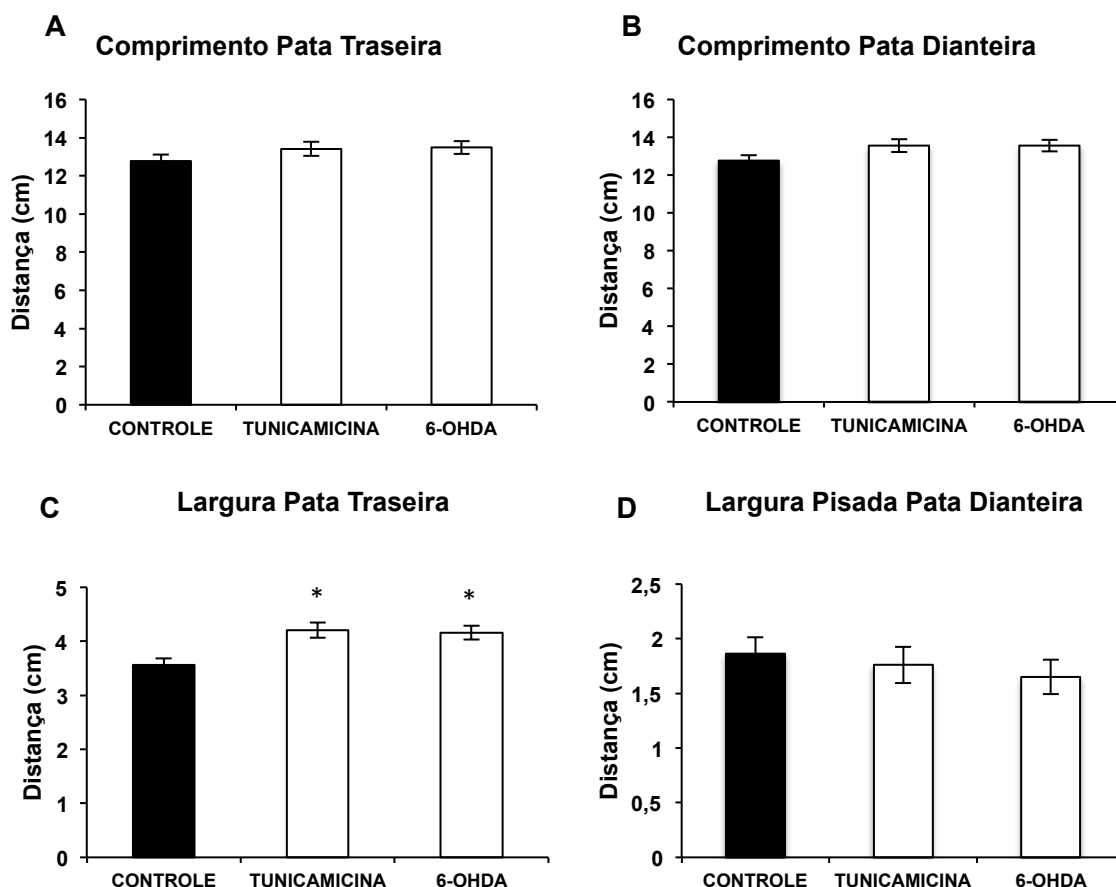


FIGURA 12.- ANÁLISE DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO FOOTPRINT. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO LOCOMOTOR DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE, TUNICAMICINA E 6-OHDA. ESTÃO AQUI PLOTADAS AS ANÁLISES DE: COMPRIMENTO ENTRE AS PATAS TRASEIRAS (A) E DIANTEIRAS (B), E LARGURA ENTRE AS PATAS TRASEIRAS (C) E DIANTEIRAS (D). \* ANOVA DE UMA VIA, SEGUIDA DE TESTE DE POST-HOC DE FISHER,  $P \leq 0,05$ . CONTROLE: N=9; TUNICAMICINA: N=8; 6-OHDA: N=9.

## 7. DISCUSSÃO

Existem vários fatores que podem estar associados à geração de doenças neurodegenerativas. Tem sido observado em modelos animais e reportado em casos clínicos, que a atuação de mecanismos associados a causas genéticas, inflamação, deficiência na geração de ATP, estresse oxidativo, estresse de RE, disfunção mitocondrial e disfunção das vias de degradação proteica são associados com o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas. No caso particular da DP, cada um dos modelos animais afetam a sobrevivência neuronal direta e/ou indiretamente, atuando em mais de um dos mecanismos patogênicos mencionados ao mesmo tempo. Desse jeito os modelos animais para DP que são utilizados atualmente falham em conseguir identificar qual é o mecanismo que dá começo a geração da doença.

O aumento observado das chaperonas de RE (GRP78 e GRP94) nos grupos injetados com Tunicamicina e 6-OHDA indicam que ambas drogas foram capazes de induzir estresse de RE na SNpc e ativar a UPR. Isso significa que o modelo da DP induzida por 6-OHDA também apresenta um componente de estresse de RE, como já tinha sido descrito (HOLTZ & O'MALLEY 2003). No entanto, neste estudo, os animais injetados com Tunicamicina e 6-OHDA não apresentaram diferenças nos níveis de expressão da PDI quando comparados ao grupo controle. Estudos *in vitro* utilizando células PC12 tem observado um aumento nos níveis de expressão da proteína PDI quando expostas a 6-OHDA. Nesse mesmo estudo Ryu e colaboradores observaram também que neurônios *perk*<sup>-/-</sup> são mais susceptíveis quando expostos a 6-OHDA, demonstrando assim a importância que tem a via da UPR na proteção celular em um modelo de DP (RYU et al., 2002).

Quando comparada com outras regiões do SNC, a SNpc é a região que apresenta menor quantidade de astrocitos. No entanto, os astrocitos são muito importantes para o funcionamento dos neurônios dopaminérgicos (MENA et al., 1996; MENA et al., 2002). Devido à relação com os neurônios, as células gliais poderiam condicionar o começo e a progressão das doenças

neurodegenerativas (BARBEITO et al., 2004; HENEKA et al., 2010; SOFRONIEW & VINTERS 2010; DIAZ-AMARILLA et al., 2011). Na DP, a ativação glial é característica de todos os modelos animais descritos, assim como de amostras *post-mortem* de doentes com Parkinson (MCGEER et al., 1988; DAMIER et al., 1993). No presente estudo demonstrou-se aumento de células gliais na SN, após o estresse de RE, gerado pela tunicamicina. A análise imuno-histoquímica permitiu observar uma importante astrogliose e microgliose em ambos modelos quando se compara com animais controle. Lembrando que os dados de astrogliose ainda são qualitativos. Essa ativação glial foi correlacionada com o aumento observado, na expressão de NF- $\kappa$ B, fator de transcrição associado com a expressão de citocinas inflamatórias, chemocinas e iNOS entre outros. Esse dados nos dá a informação que as células recrutadas para o local da injeção estão funcionalmente ativas, liberando citocinas inflamatórias. Além disso, diferentes estudos tem demonstrado que a inibição específica da iNOS em modelos de Parkinson tem um efeito neuroprotetor sobre os neurônios dopaminérgicos (LIBERATORE et al., 1999; DEHMER et al., 2000; BROOM et al., 2011). Ou seja, a inibição desse processo inflamatório, de alguma forma, apresenta um efeito protetor, e dessa forma, a existencia dessas células e de citocinas inflamatórias na região da administração, tanto de tunicamicina quanto de 6-OHDA, estariam promovendo o processo de lesão e morte celular local.

Além disso, a ativação glial, observada por imuno-histoquímica, associada ao aumento nos níveis de expressão de NF- $\kappa$ B, observados pela técnica de western blot, estão associados com um aumento no número de células imuno-marcadas para caspase-3 no sítio da lesão. O aumento no número de células caspase-3 ativada+ foi observado tanto pelo estresse de RE diretamente (no caso do modelo de tunicamicina), quanto indiretamente (no modelo de 6-OHDA). Existem estudos evidenciando que mediadores inflamatórios liberados por células gliais podem modular a progressão da morte de neurônios dopaminérgicos na DP (HIRSCH & HUNOT, 2009). Em particular, essa ativação glial na DP pode participar na morte de neurônios dopaminérgicos pela ativação de apoptose via citocinas e a produção de óxido nítrico (LAPOINTE et al., 2004). As citocinas liberadas por astrócitos podem se unir aos receptores neuronais TNFR1 e TNFR2 e ativar mecanismos proapoptóticos

através da ativação de caspase-3 (HIRSCH et al., 2003). Dessa forma, o aumento na expressão de caspase-3 ativada na SN dos animais que receberam 6-OHDA e tunicamicina demonstra as células estão em processo de morte celular, possivelmente gerados pelo processo inflamatório local. Além disso, o papel da inflamação no processo neurodegenerativo da DP nos induz a pensar que a inibição do NF- $\kappa$ B emerge como um possível alvo no tratamento desta doença.

Após observar que os dois modelos induzem a morte celular na SNpc, nós perguntamos se a população de neurônios dopaminérgicos tinha sofrido após a lesão gerada. Para isso, utilizamos imuno-histoquímica com intenção de observar se o número de neurônios dopaminérgicos tinha diminuído. A análise mostrou uma pequena diminuição no número de neurônios dopaminérgicos, mas não foi estatisticamente significativa 7 dias após a microinjeção de Tunicamicina. A quantificação dos níveis de TH por Western-blot também não apresentou dados estatisticamente significantes. No entanto, é importante levar em consideração que a análise foi realizada pontualmente 7 dias após a microinjeção, num momento com altos níveis ainda de caspase-3 ativada, tanto para os animais que receberam tunicamicina, quanto para os animais do grupo 6-OHDA; ou seja, ainda existe um processo de morte celular acontecendo. Dessa forma, sugere-se que outros períodos, maiores que 7 dias após a administração de tunicamicina, devam ser testados e analisados na tentativa de se encontrar diminuição nos níveis de DA, ou no número de células TH+.

O fato de que o número de neurônios dopaminérgicos não tenha diminuído nos animais injetados com 6-OHDA, significa que a morte desses neurônios ainda não aconteceu, mas não significa que comunicação neuronal não esteja afetada. Na verdade, considerando a ativação glial e o processo inflamatório sugerido pelo aumento de NF- $\kappa$ B, é lógico pensar que seguramente esteja afetando o funcionamento neuronal. Baseado nesses dados obtidos, torna-se necessário realizar um estudo ultra-estrutural para observar efeitos da 6-OHDA no nível sináptico. Por outro lado, a alta expressão de caspase-3 ativa implica que a morte celular é um processo que está ativo, mas que talvez ainda não conseguiu matar esses neurônios dopaminérgicos. Motivo pelo qual torna-se necessário realizar no futuro imuno-histoquímica dupla com intenção de marcar

células caspase-3<sup>+</sup> e células TH<sup>+</sup>, e conseguir identificar a quantidade de neurônios dopaminérgicos que estão expressando caspase-3 ativa.

A vantagem que apresentam os modelos animais frente aos modelos celulares para o estudo das doenças neurodegenerativas, é a possibilidade de utilizar métodos que avaliem o comportamento animal, com intenção de comprovar se o modelo utilizado realmente é efetivo e equivalente à sintomatologia presente nos humanos com DP. No presente trabalho, avaliamos o comportamento locomotor dos animais utilizando 2 testes diferentes: campo aberto e footprint. O primeiro teste permite estudar o comportamento locomotor quando a lesão é muito grande, no entanto, o footprint é um teste que permite avaliar detalhes mais finos do comportamento locomotor nos animais. Para o teste de campo aberto, os animais não apresentaram diferenças estatísticas para nenhum dos parâmetros relacionados à locomoção avaliados com esse teste. No entanto os animais microinjetados com tunicamicina apresentaram um aumento na quantidade de eventos de comportamento de auto-limpeza e de exploração, padrões comportamentais estreitamente associados com ansiedade. Enquanto nenhuma diferença na locomoção foi observada no campo aberto, o teste de footprint permitiu observar diferenças na locomoção dos animais dos grupos Tunicamicina e 6-OHDA quando comparados com o grupo Controle. Os animais de ambos grupos apresentaram uma maior separação entre as patas traseiras, o que indica que a lesão gerada em ambos modelos foram capazes de induzir problemas locomotores. O fato dos animais apresentarem uma separação maior das patas traseiras pode indicar uma forma de compensação postural na locomoção, em busca do equilíbrio. No entanto, devido à conectividade que a SN apresenta com o corpo estriado e com o córtex, estruturas vinculadas ao controle motor, é possível considerar que as diferenças observadas na locomoção sejam resultado de alterações nas vias nigro-estriatal ou nigro-cortical, e não somente ser um reflexo direto da lesão da SNpc. Nos próximos ensaios pretende-se abordar esse assunto, estudando essas estruturas, para comprovar essa hipótese, e mediante outras abordagens, como por microscopia eletrônica.



Particularmente na DP, foi demonstrado, num modelo animal de vertebrados inferiores (peixe medaka), que o estresse de RE gerado pela administração de tunicamicina no fluído cérebro espinal é estímulo suficiente para induzir Parkinsonismo (MATSUI et al., 2010; MATSUI et al., 2012). Nesse estudo os pesquisadores conseguiram remedar características próprias da DP, como ser a morte de neurônios dopaminérgicos, geração de corpos de inclusão e gerar problemas locomotores, o que denota o potencial que apresenta o estresse de RE na DP. No entanto, esse modelo apresenta uma desvantagem principal, a qual radica em que a lesão é feita por uma micro-injeção de tunicamicina líquido cefalorraquidiano (LCR). Nesse tipo de lesão está implícito que a tunicamicina vai ser distribuída pelo LCR, e gerar estresse de RE em todo o SNC, o que não acontece necessariamente na DP. No entanto, esse modelo é eficiente na indução da morte de neurônios dopaminérgicos, e remedando outras características da DP como a geração de corpos de inclusão e gerar problemas locomotores. Por outro lado, a limitação principal de um modelo em peixe, está na dificuldade da extrapolação dos dados comportamentais, na equivalência com os dados de humanos. Para avançar na compreensão de qual é o mecanismo principal capaz de desencadear as características patológicas desta patologia, há a necessidade de modelos animais com análises comportamentais a serem exploradas e fatores casuísticos isolados, como o caso do estresse de RE.

A DP é uma doença neurodegenerativa que afeta principalmente pessoas de idade avançada, indicando que o maior fator de risco na DP é o envelhecimento. Isso foi demonstrado tanto epidemiologicamente, como em modelos animais de DP utilizando rotenona e MPTP, onde foi observado uma maior predisposição a desenvolver a doença em animais idosos em comparação com animais novos (OVADIA et al., 1995; PASCHEN & FRANDSEN 2001). Por outro lado, as chaperonas do RE diminuem de nível e são mais susceptíveis a oxidação com o envelhecimento (NAIDOO 2009). Baseado nesses dados, sugere-se que o aumento da susceptibilidade ao estresse de RE (relacionada ao envelhecimento) é capaz de afetar a síntese proteica e favorecer a formação de agregados proteicos, aumentando assim a vulnerabilidade celular, sendo estímulo suficiente para desencadear uma doença neurodegenerativa.

Os modelos animais são de muita valia para o estudo das patologias neurodegenerativas devido à vantagem de conseguir um correlato celular, molecular e comportamental. Acredito necessário que devem ser compreendidas e consideradas as vantagens e desvantagens de cada modelo prévio ao estudo de uma patologia, com intenção de utilizar o modelo mais apropriado na hipótese a ser testada. Nesse trabalho apresentado, desenvolveu-se um modelo de DP em busca de uma alternativa aos modelos existentes para o estudo da DP dado que, apesar dos modelos existentes até o momento conseguirem desencadear as características patológicas da DP, não procuram um mecanismo que explique o começo dessa doença. Nesse estudo, o foco de pesquisa foi demonstrar que o estresse de RE (uma organela afetada em todas as neuropatologias), pode ser considerado como necessário e suficiente para o desencadeamento da DP. Sugere-se aqui então que o modelo baseado diretamente no estresse de RE apresenta alto potencial para o estudo da DP, uma vez que apresentou-se como um modelo válido, gerando alterações locomotoras e anatomopatológicas semelhantes às observadas no modelo de 6-OHDA, modelo já estabelecido e utilizado no estudo da DP.

## 8. CONCLUSÕES

- Tunicamicina e 6-OHDA aumentaram estresse de RE na SNpc.
- Os animais dos grupos Tunicamicina e 6-OHDA apresentaram aumento de Reatividade Glial no foco da lesão.
- Quando comparado com o grupo Controle, foi observada uma indução da morte celular na SNpc em animais injetados com Tunicamicina e 6-OHDA, observado pelo aumento na quantidade de células imunomarcadas com Caspase-3 ativada.
- Após de gerada a lesão, não foi observada diminuição na quantidade de neurônios dopaminérgicos nem na quantidade de TH expressada na SNpc.
- Os animais dos grupos Tunicamicina e 6-OHDA apresentaram diferenças no comportamento locomotor quando comparados com o grupo controle.
- Quando comparamos o modelo apresentado nesse trabalho e o modelo da 6-OHDA, concluímos que nosso modelo apresenta alto potencial para o estudo da DP.

## 9. PERSPECTIVAS

- Avaliar níveis de DA em SNpc e no Corpo Estriado.
- Avaliar efeito da lesão a diferentes tempos.
- Observar se existem diferenças na expressão de fatores inflamatórios nos diferentes grupos.
- Os animais dos grupos Tunicamicina e 6-OHDA apresentaram diferenças no comportamento locomotor quando comparados com o grupo controle.
- Avaliar comportamento não motor como: Cognição, Olfato, Ansiedade, Depressão e Sono no modelo apresentado nesse trabalho.

## 10. REFERÊNCIAS

BENDER, A; KRISHNAN, K.J.; MORRIS, C.M.; TAYLOR, G.A.; REEVE, A.K.; PERRY, R.H.; JAROS, E; HERSHESON, J.S.; BETTS, J; KLOPSTOCK, T; TAYLOR, R.W.; TURNBULL, D.M. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. **Nat Genet**, v. 38, n. 5, p. 515–517, 2006.

BERKE, S.J.; PAULSON, H.L. Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPer hand on neurodegeneration. **Curr Opin Genet Dev**, v. 13, n. 3, p. 253-61, 2003.

BERNALES, S; MORALES SOTO, M; MCCULLAGH, E. Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 1-13, 2012.

BEZARD, E; DOVERO, S; PRUNIER, C; RAVENSCROFT, P; CHALON, S; GUILLOTEAU, D; CROSSMAN, A.R.; BIOULAC, B; BROTCHE, J.M.; GROSS, C.E. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 21, p. 6853–6861, 2001.

BLESA, J.; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. **J of Biomed and Biotech**, v. 2012, p. 845618, 2012.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's Disease. *NeuroRX: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, v. 2, n. 3, p. 484-494, 2005.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease.

**Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, 2012.

BOYCE, M.; YUAN, J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 3, p. 363-373, 2006.

BRAAK, H.; BRAAK, E.J. Pathoanatomy of Parkinson's disease. **Neurology** v. 247, n. 2, p. II3-II10, 2000.

BUCCAFUSCO, J. Methods of behavior analysis in neuroscience. **CRC Press**, 2001.

CASTRO-CALDAS, M.; CARVALHO, A.N.; RODRIGUES, E.; HENDERSON, C.J.; WOLF, C.R.; RODRIGUES, C.M.; GAMA, M.J. Tauroursodeoxycholic acid prevents MPTP-induced dopaminergic cell death in a mouse model of Parkinson's disease. **Mol Neurobiol**, v. 46, n. 2, p. 475-486, 2012.

CHADE, A.R.; KARSTEN, M.; TANNER, C.M. Nongenetic causes of Parkinson's disease. **J Neural Transm Suppl**, v. 70, p. 147-151, 2006.

CHATTOPADHYAY, M.; VALENTINE, J. Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 7, p. 1603-1614, 2009.

COSTA, G.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; DAJAS, F. Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesions in the substantia nigra. **Brain Res**, v. 888, p. 336-342, 2001.

COUSINS, R.; HANLEY, J.R.; DAVIES, A.D.M.; TURNBULL, C.J.; PLAYFER, J.R. Understanding memory for faces in Parkinson's disease: the role of configural processing. **Neuropsychology**, v. 38, p. 837-847, 2000.

CUERVO, A.M.; STEFANIS, L.; FREDENBURG, R.; LANSBURY, P.T.; SULZER, D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-

mediated autophagy. **Science**, v. 305, n. 5688, p. 1292-1295, 2004.

DA SILVA, T.M.; MUNHOZ, R.P.; ALVAREZ, C.; NALIWAIKO, K.; KISS, A.; ANDREATINI, R.; FERRAZ, A.C. Depression in Parkinson's disease: A Double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **J of Affect Disorders**, v. 111, n. 2-3, p. 351-359, 2008.

DANIELSON, S.R.; ANDERSEN, J.K. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 44, p. 1787–1794, 2008.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science**, v. 302, p. 819-822, 2003.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's Disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Science**, v. 14, p. 4886-4902, 2002.

DÍAZ, M.R.; ABDALA, P.; BARROSO-CHINEA, P.; OBESO, J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. Motor behavioural changes after intracerebro ventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 122, p. 79-92, 2001.

DIAZ-AMARILLA, P.; OLIVERA-BRAVO, S.; TRIAS, E.; CRAGNOLINI, A.; MARTÍNEZ-PALMA, L.; CASSINA, P.; BECKMAN, J.; BARBEITO, L. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. **PNAS**, v. 108, n. 44, p. 18126-18131, 2011.

EKSTRAND, M.I.; TERZIOGLU, M; GALTER, D; ZHU, S; HOFSTETTER, C; LINDQVIST, E; THAMS, S; BERGSTRAND, A; HANSSON, F.S.; TRIFUNOVIC, A; HOFFER, B; CULLHEIM, S; MOHAMMED, A.H.; OLSON, L; LARSSON, N.G. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. **PNAS**, v. 104, n. 4, p. 1325-30, 2007.

EMBORG, M.E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **J of Neuros Methods**, v. 139, p. 121-143, 2004.

FARRER, M.; WAVRANT-DE VRIEZE, F.; CROOK, R.; BOLES, L.; PEREZ-TUR, J.; HARDY, J.; JOHNSON, W.G.; STEELE, J.; MARAGANORE, D.; GWINN, K.; LYNCH, T. Low frequency of alpha-synuclein mutations in familial Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 43, n. 3, p. 394-7, 1998.

GARCIA-BORREGUERO, D.; LARROSA, O.; BRAVO, M. Parkinson's disease and sleep. **Sleep Medicine Reviews**, v. 7, n. 2, p. 115-129, 2003.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 2, p. 89-112, 2012.

HOSOI, T; OSAWA, K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. **Clinical Science**, v. 118, n. 1, p. 19-29, 2010.

HOWELLS, F.M.; RUSSELL, V.A.; MABANDLA, M.V.; KELLAWAY, L.A. Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 165, p. 210-220, 2005.

JELLINGER, K. Morphological substrates of parkinsonism with and without dementia: a retrospective clinico-pathological study. **J of Neural Transm**, v. 72, p. 91-104, 2007.

KANAZAWA, I. How do neurons die in neurodegenerative diseases? **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 7, n. 8, p. 339-344, 2001.



KEANE, P.C.; KURZAWA, M.; BLAIN, P.G.; MORRIS, C.M. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 716871, 2011.

KEENE, C.D.; RODRIGUES, C.M.; EICH, T.; CHHABRA, M.S.; STEER, C.J.; LOW, W.C. Taurosursodeoxycholic acid, a bile acid, is neuroprotective in a transgenic animal model of Huntington's disease. **PNAS**, v. 99, n. 16, p. 10671-10676, 2002.

KLEIN, C.; WESTERNBERGER, A. Genetics of Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2012.

KLIVENYI, P.; SIWEK, D.; GARDIAN, G.; YANG, L.; STARKOV, A.; CLEREN, C.; FERRANTE, R.J.; KOWALL, N.W.; ABELIOVICH, A.; BEAL, M.F. Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins. **Neurobiol Dis**, v. 21, n. 3, p. 541-548, 2006.

LAPOINTE, N.; ST-HILAIRE, M.; MARTINOLI, M.G.; BLANCHET, J.; GOULD, P.; ROUILLARD, C.; CICCHETTI, F. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 6, p. 717-719, 2004.

LEAVER, D.D.; SCHNEIDER, K.M.; RAND, M.J.; ANDERSON, R.MCD.; GAGE, P.W.; MALBON, R. The neurotoxicity of tunicamycin. **Toxicology**, v. 49, p. 179-187, 1988.

LEVY O, MALAGELADA C, AND GREENE L. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 478–500, 2009.

LINDHOLM, D; WOOTZ, H; KORHONEN, L. ER stress and neurodegenerative diseases. **Cell Death and Differentiation**, v.13, p. 385-392, 2006.

MAGEN, I, CHESSELET, M.F. Genetic mouse models of Parkinson's disease. The state of the art. **Prog Brain Res**, v. 184, p. 53-87, 2010.

MARCINIAK, S.J.; RON, D. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Disease. **Physiol Rev**, v. 86, p. 1133-1149, 2006.

MARTIN, L.J.; PAN, Y; PRICE, A.C.; STERLING, W; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; PRICE, D.L.; LEE, M.K. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial. **J Neurosci**, v. 26, n. 1, p. 41-50, 2006.

MARTINEZ-VICENTE, M.; TALLOCY, Z.; KAUSHIK, S.; MASSEY, A.C.; MAZZULLI, J.; MOSHAROV, E.V.; HODARA, R.; FREDENBURG, R.; WU, D.C.; FOLLENZI, A.; DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S.; ISCHIROPOULOS, H.; LANSBURY, P.T.; SULZER, D.; CUERVO, A.M. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. **J Clin Invest**, v. 118 n. 2, p. 777-88, 2008.

MATSUI, H; ITO, H; TANIGUCHI, Y; TAKEDA, S; TAKAHASHI, R. Ammonium chloride and tunicamycin are novel toxins for dopaminergic neurons and induce Parkinson's disease-like phenotypes in medaka fish. **J Neurochem**, v. 115, n. 5, p. 1150-1160, 2010.

MATSUI, H; GAVINIO, R; TAKAHASHI, R. Medaka Fish Parkinson's Disease Model. **Experimental Neurobiology**, v. 21, n. 3, p. 94-100, 2012.

MAYEUX, R. Epidemiology of Neurodegeneration. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 81-104, 2003.

MCNAUGHT KS, JENNER P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 297, n. 3, p. 191-4, 2001.

MIZUNO, Y; HATTORI, N; MORI, H; SUZUKI, T; TANAKA, K. Parkin and

Parkinson's disease. **Curr Opinion in Neurol**, v. 14, p. 477-482, 2001.

MUÑOZ, E.; OLIVA, R.; OBACH, V.; MARTÍ, M.J.; PASTOR, P.; BALLESTA, F.; TOLOSA, E. Identification of Spanish familial Parkinson's disease and screening for the Ala53Thr mutation of the alpha-synuclein gene in early onset patients. **Neurosci Lett**, v. 235, n. 1-2, p. 57-60, 1997.

NALIWAIKO, K.; ARAUJO, R.L.F.; DA FONSECA, R.V.; CASTILHO, J.C.; ANDREATINI, R.; BELLISSIMO, M.I.; OLIVEIRA, B.H.; MARTINS, E.F.; CURI, R.; FERNANDES, L.C.; FERRAZ, A.C. Effects of fish oil on the central nervous system: A new potential antidepressant. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 91-99, 2004.

NIETO, M.; GIL-BEA, F.J.; DALFO, E.; CUADRADO, M.; CABODEVILLA, F.; SANCHEZ, B.; CATENA, S.; SESMA, T.; RIBE, E.; FERRER, I.; RAMÍREZ M.J.; GÓMEZ-ISLA, T. Increased sensitivity to MPTP in human alpha-synuclein A30P. **Neurobiol Aging**, v. 27, n. 6, p. 848-856, 2006.

NIXON, R.A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. **Nat Med Rev**, v. 19, n. 8, p. 983-987, 2013.

OLANOW, C.W. The pathogenesis of the cell death in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 22, n. 17, p. s335-342, 2007.

OMURA, T.; KANCKO, M.; OKUMA, Y.; MATSUBARA, K.; NOMURA, Y. Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: the role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013:239854. 2013

ORCI, L.; TAGAYA, M.; AMHERDT, M.; PERRELET, A.; DONALDSON, J.G.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; KLAUSNER, R.D.; ROTHMAN, J.E. Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. **Cell**, v. 64, p. 1183-1195, 1991.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain stereotaxic coordinates. San Diego: **Academic Press**, 1997.

PALLIER, P.N.; DREW, C.J.G.; MORTON, A.J. The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: Influence of non-motor factors on locomotor function. **Brain Res Bull**, v. 78, p. 347–355, 2009.

PESAH, Y.; PHAM, T.; BURGESS, H.; MIDDLEBROOKS, B.; VERSTREKEN, P.; ZHOU, Y.; HARDING, M.; BELLEN, H.; MARDON, G. Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. **Development**, v. 131, n. 9, p. 2183-2194, 2004.

POLYMEROPOULOS, M.H.; HIGGINS, J.J.; GOLBE, L.I.; JOHNSON, W.G.; IDE, S.E.; DI IORIO, G.; SANGES, G.; STENROOS, E.S.; PHO, L.T.; SCHAFFER, A.A.; LAZZARINI, A.M.; NUSSBAUM, R.L.; DUVOISIN, R.C. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science**, v. 274, n. 5290, p. 1197-1199, 1996.

POLYMEROPOULOS, M.H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; IDE, S.E.; DEHEJIA, A.; DUTRA, A.; PIKE, B.; ROOT, H.; RUBENSTEIN, J.; BOYER, R.; STENROOS, E.S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ATHANASSIADOU, A.; PAPAPETROPOULOS, T.; JOHNSON, W.G.; LAZZARINI, A.M.; DUVOISIN, R.C.; DI IORIO, G.; GOLBE, L.I.; NUSSBAUM, R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2045-2047, 1997.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.; LAMANTIA, A.; MCNAMARA, J.; WILLIAMS, S. Neuroscience. Capitulo 17: Modulation of Movement by the Basal Ganglia. 3<sup>rd</sup> ed. Edition. **Sinauer Associates**, 2004.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, p. S3-S7, 2005.

PRZEDBORSKI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; NAINI, A.; JAKOWEC, M.; PETZINGER, G.; MILLER, R.; AKRAM, M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. **J of Neurochem**, v. 76, n. 5, p. 1265-1274, 2001.

RAPPOLD, P.M.; TIEU, K. Astrocytes and Therapeutics for Parkinson's Disease. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 413-423, 2011.

RAVENSTIJN, G.M.; MERLINI, M; HAMEETMAN, M; MURRAY, T.K.; WARD, M.A.; LEWIS, H; BALL, G; MOTTART, C; VILLE DE GOYET, C; LEMARCHAND, T; VAN BELLE, K; O'NELL, M; DANHOF, M; LANGE, E. The exploration of rotenone as a toxin for inducing Parkinson's disease in rats, for application in BBB transport and PK-PD experiments. **J of Pharm and Tox Methods**, v. 57, p. 114-130, 2008.

REDGRAVE, P; RODRIGUEZ, M; SMITH, Y; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; LEHERICY, S; BERGMAN, H; AGID, Y; DELONG, M.R.; OBESO, J.A. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 11, p. 760-772, 2010.

RIDEOUT, H.J.; LANG-ROLLIN, I.; STEFANIS, L. Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 26, n. 12, p. 2551-2561, 2004.

RUTKOWSKI, D.T.; ARNOLD, S.M.; MILLER, C.N.; WU, J.; LI, J.; GUNNISON, K.M.; MORI, K.; SADIGHI AKHA, A.A.; RADEN, D.; KAUFMAN, R.J. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. **PloS Biology**, v. 4, n. 11, p. e374, 2006

SCHAPIRA, A.H.; MANN, V.M.; COOPER, J.M.; KRIGE, D.; JENNER, P.J.; MARSDEN, C.D. Mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. **Ann Neurol**, v. 32, p. S116–124, 1992.

SCHAPIRA, A.H. Etiology of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 66, p. S10-S23, 2006.

SCOTT, W.K.; STAJICH, J.M.; YAMAOKA, L.H.; SPEER, M.C.; VANCE, J.M.; ROSES, A.D.; PERICAK-VANCE, M.A. Genetic complexity and Parkinson's disease. Deane Laboratory Parkinson Disease Research Group. **Science**, v. 277, n. 5324, p. 387-388, 1997.

SCOTT, W.K.; YAMAOKA, L.H.; STAJICH, J.M.; SCOTT, B.L.; VANCE, J.M.; ROSES, A.D.; PERICAK-VANCE, M.A.; WATTS, R.L.; NANCE, M.; HUBBLE, J.; KOLLER, W.; STERN, M.B.; COLCHER, A.; ALLEN, F.H. JR.; HINER, B.C.; JANKOVIC, J.; ONDO, W.; LAING, N.G.; MASTAGLIA, F.; GOETZ, C.; PAPPERT, E.; SMALL, G.W.; MASTERMAN, D.; HAINES, J.L.; DAVIES, T.L. The alpha-synuclein gene is not a major risk factor in familial Parkinson disease. **Neurogenetics** v. 2, n. 3, p. 191-2, 1999.

SHERER, T.B.; RICHARDSON, J.R.; TESTA, C.M.; SEO, B.B.; PANOV, A.V.; YAGI, T.; MATSUNO-YAGI, A.; MILLER, G.W.; GREENAMYRE, J.T. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 100, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

SHIMURA, H.; HATTORI, N.; KUBO, S.; MIZUNO, Y.; ASAKAWA, S.; MINOSHIMA, S.; SHIMIZU, N.; IWAI, K.; CHIBA, T.; TANAKA, K.; SUZUKI, T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nat Genet**, v. 25, n. 3, p. 302-305, 2000.

SIMUNI T. Diagnosis and management of Parkinson's disease. **Medscape Neurology**, August 30, 2007.

SINGH, N.; PILLAY, V. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 81, p. 29-44, 2007.

SPILLANTINI, M.G.; CROWTHER, A.R.; JAKES, R.; HASEGAWA, M.; GOEDERT, M.  $\alpha$ -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **PNAS**, v. 95, p. 6469-6473, 1998.

STOKES, A.H.; HASTINGS, T.G.; VRANA, K.E. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. **J Neurosci Res**, v. 55, p. 659–665, 1999.

TADAIESKY, M.; DOMBROWSKI, P.; FIGUEIREDO, C.; CARGNIN-FERREIRA, E.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 156, p. 830-840, 2008.

THOMAS, B.; BEAL, M.F. Parkinson's disease. **Hum Mol Genet**, v. 16, p. R183-94, 2007.

TOLOSA, E.; COMPTA, Y.; GAIG, C. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism Related Disorders**, v. 13, p. S2-S7, 2007.

TSAI, Y.C.; WEISSMAN, A.M. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. **Genes & Cancer**, v. 1, n. 7, p. 764-778, 2010.

TSANG, A.H.; CHUNG, K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 7, p. 643-650, 2009.

WANG, X.F.; LI, S.; CHOU, A.P.; BRONSTEIN, J.M. Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 23, n. 1, p. 198-205, 2006.

WEBB, J.L.; RAVIKUMAR, B.; ATKINS, J.; SKEPPER, J.N.; RUBINSZTEIN, D.C. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. **J Biol Chem**, v. 278, n. 27, p. 25009-13, 2003.

YOSHIDA, H. ER stress and diseases. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 3, p. 630-658, 2007.

ZHU, Y.; FENIK, P.; ZHAN, G.; SANFILLIPO-COHN, B.; NAIDOO, N; VEASEY, S.C. Eif-2a protects brainstem motoneurons in a murine model of sleep apnea. **J of Neurosci**, v. 28, n. 9, p. 2168-2178, 2008.



# 11. ANEXO



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 778

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

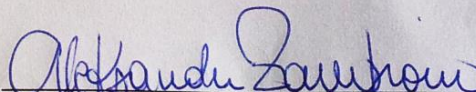
**PROCESSO:** 23075.014228/2014-12

**APROVADO:** 24/04/2014 – R.O. 03/2014

**TÍTULO:** Caracterização de novo modelo *in vivo*, em Doença de Parkinson baseado no estresse celular

**AUTORES:** Silvio Marques Zanata, Clarissa Fantin Cavarsan, Valentin Cópola

**DEPARTAMENTO:** Patologia Básica

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
Coordenador da CEUA